

UNDERSØGELSER OVER
B-VITAMINMAALINGER

— SPECIELT I GÆR —

VED HJÆLP AF ROTTEVÆKSTMETODEN

AF

H. KRIEGER LASSEN



LEVIN & MUNKSGAARD

EJNAR MUNKSGAARD

KØBENHAVN · 1935

UNDERSØGELSER OVER
B-VITAMINMAALINGER -- SPECIELT I GÆR -- VED
HJÆLP AF ROTTEVÆKSTMETODEN

*Forsvaret finder Sted Tirsdag d. 25. Juni 1935
Kl. 2 i Anneksauditorium A, Studiestræde 6, o. G.*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153508_0009

UNDERSØGELSER OVER
B-VITAMINMAALINGER
— SPECIELT I GÆR —

VED HJÆLP AF ROTTEVÆKSTMETODEN

AF

H. KRIEGER LASSEN



LEVIN & MUNKSGAARD

EJNAR MUNKSGAARD
KØBENHAVN • 1935

*Denne Afhandling er af det lægevidenskabelige Fakultet
antaget til offentlig at forsvares for den medicinske Doktorgrad.*

København, den 26. Marts 1935.

Rich. Ege,
h. a. dec.

Printed in Denmark

—
VALD. PEDERSENS BOGTRYKKERI
KØBENHAVN

INDHOLDSFORTEGNELSE.

	Side
Indledning	9
I Kapitel. <i>Historisk oversigt og valg af metode</i>	11
1) Kort gengivelse af de vigtigste historiske begivenheder indenfor B-vitaminforskningen	11
2) Kvantitativ B-vitaminbestemmelse. Kort historisk udvikling	18
3) Diskussion og valg af metode	32
4) Almindelige elementære krav ved B-vitaminundersøgelser paa rotter	38
II Kapitel. <i>Indledende forsøg</i>	45
1) Tidligere anvendt teknik ved B-vitaminundersøgelser samt drøftelse af grundkostens egnethed	45
2) Orienterende vækstforsøg med rotter paa varierende doser af forskellige gærsorter	48
3) Forsøg paa fremstilling af B _I - og B _{II} -vitaminekstrakter særskilt	50
Forskellige B _{II} -vitaminkilder	54
Forskellige B _I -vitaminkilder	56
Forskellige kaseinrensningsprocesser	60
Bestemmelse af sufficient mængde B _I -vitamin som Peters B _I -ekstrakt og B _{II} -vitamin som autoklaveret spritgærekstrakt	66
III. Kapitel. <i>Udarbejdelse af grundlaget for udførelsen af metoden til kvantitativ B_I- og B_{II}-vitaminbestemmelse</i>	69
1) Gennemgang af standardkurver	69
2) Svingninger i kostmængden hos dyr paa samme B-vitaminsyndrom	79
3) Holdbarheden af den internationale B _I -vitaminstandard samt af vort B _{II} -vitaminekstrakt	82
4) Forsøg over alderens og begyndelsesvægtens betydning hos vore forsøgsdyr for de gennem disses vægtskurver opnaaede resultater	83
5) Hvilke dele af B-vitaminkomplekset kan bestemmes gennem anvendelse af vore standardkurver?	88
6) Forskellige vanskeligheder, der kan opstaa under udførelsen af B _I - og B _{II} -vitaminbestemmelse ved hjælp af rottevækstmetoden	89
IV Kapitel. <i>Sammenlignende statistiske vurderinger af nogle forskellige maalemetoder for B-vitamin</i>	92

	Side
1) Indledende bemærkninger	92
2) Andres arbejder	94
3) Egne forsøg	98
4) Sammenligning mellem metoderne	105
 V Kapitel. <i>Forsøg over visse præparationers omtrentlige B_I- og B_{II}-vitaminindhold og diskussion af disses anvendelighed ved kvantitative B_I- og B_{II}-vitaminbestemmelser</i>	107
1) Kinnersley og Peters B _I -ekstrakt	107
2) International standard acid clay preparation	108
3) Aktiveret stivelse	108
4) B _{II} -vitaminekstrakt	109
5) Forskellige proteinpræparationer	111
 VI Kapitel. <i>Forskellige gærsorters indhold af B-vitaminer og dette indholds relation til dyrkningsmediet</i>	113
1) Indledning	113
2) Historisk gennemgang	114
3) Egne undersøgelser	127
Almindelig teknik	127
Indledende undersøgelser	129
Vor gærdyrkningsteknik	133
Forskellige forsøg paa acceleration af gærvækst i syntetisk substrat	136
Indhold af B _I - og B _{II} -vitamin i overgær, undergær og spritgær	145
Indhold af B _I - og B _{II} -vitamin i Readers substrat ...	148
Indhold af B _I - og B _{II} -vitamin i syntetisk gær	149
Indhold af B _I - og B _{II} -vitamin i syntetisk gær efter videredyrkning i ølurt	150
Indhold af B _I - og B _{II} -vitamin i Readers substrat efter dyrkning af gær i dette	151
Indhold af B _I - og B _{II} -vitamin i ølurt	152
 VII Kapitel. <i>Forskellige iagttagelser vedrørende forekomsten af rottepolyneuritis (beri-beri) og rottedermatitis (pellagra) i vort materiale</i>	154
1) Indledning	154
2) Literatur angaaende uspecifike dermatiter	154
3) Egne tilfælde af rotteberi-beri	158
4) » » » rottepellagra	160
5) » » » proteindermatitis	162
6) Kurative forsøg	163
7) Illustrationer	165
8) Refektionens hyppighed i vort materiale	181
 Résumé	183
Literaturfortegnelse	186

FORORD.

Nærværende arbejde er udført paa universitetets hygiejniske institut og statens vitaminlaboratorium, hvis chef, professor dr. med. L. S. Fridericia, jeg er megen tak skyldig for tilskyndelsen til disse undersøgelser, for venlig interesse under udarbejdelsen og for fortrinlige arbejdsforhold.

Navnlig under arbejdets første tilrettelæggelse har jeg modtaget udmærket vejledning af overlæge dr. med. Skuli Gudjonsen og institutets tidligere assistent, dr. med. Sv. Clemmesen, hvis dybtgaaende kendskab til beslægtede emner har været mig til stor støtte.

Endvidere takker jeg institutets nuværende assistent, dr. Tage Lund, for værdifuld praktisk hjælp ved udførelsen af flere laboratorieforsøg.

For vejledning i gær dyrkningsteknik og for gæstfri modtagelse paa tuborglaboratoriet beder jeg dettes chef, ingeniør cand. polyt. B. Krause, modtage min bedste tak.

Afhandlingens IV. kapitel — bogens statistiske del — er gennemarbejdet af dr. phil. Rasch. Paa grund af manglende statistiske kundskaber har jeg næret stor betænkelighed ved at medtage dette afsnit; naar det alligevel er sket, skyldes det min overbevisning om, at arbejdet som helhed herved vinder i værdi. Jeg er dr. phil. Rasch meget taknemlig for det store arbejde, der er lagt i dette afsnit.

En ganske særlig tak retter jeg til frk. Marie Schousboe for den omhu og akkuratesse, hvormed hun har hjulpet mig, navnlig med pasningen af det store antal forsøgsdyr. Ogsaa de to institutters øvrige kvindelige assistenter, spec. fruene Abrahams og Moltke, vil jeg gerne her takke for velvillig hjælp i den forløbne tid.

Hygiejnisk instituts vagtmester, hr. Jensen, og laboratoriebjetjent, hr. Stenild, har været mig til stor nytte ved det daglige arbejde samt ved fotografering af forsøgsdyr og tabeller.

Tuborgfondet, der har ydet betydelig økonomisk støtte til arbejdets udførelse, bringer jeg min bedste tak.

INDLEDNING.

De senere aars arbejder paa B-vitaminforskningens omraade, hvorved man har opdaget, at B-vitamin ikke længere maa opfattes som en afgrænset helhed, men derimod er en gruppe vitaminer, har nødvendiggjort, at man her i landet som i andre lande har maattet udarbejde metoder til bestemmelsen af disse vitaminer særskilt.

Et nøjere kendskab navnlig til B_I- og B_{II}-vitaminindholdet i vore fødemidler har ikke alene en teoretisk, men ogsaa en praktisk interesse; thi velafgrænsede kendte sygdomme forskellige for de nævnte vitaminer opstaar, naar disse mangler i føden — navnlig i de lidet varierede diætkoster — og helbredes, naar man giver patienterne det rette vitamin.

Det har været vor opgave gennem dette arbejde — til praktisk og videnskabelig brug — at forsøge at tilrettelægge og gennemprøve en metode til kvantitative B_I- og B_{II}-vitaminbestemmelser.

Ved hjælp af denne metode har vi søgt at udforske, om gær, der er en af de rigeste B-vitaminkilder, man kender, selv formaar at syntetisere B-vitamin, eller dette blot ad- eller absorberes under gærens vækst i B-vitaminholdige substrater.

Dette spørgsmaal har væsentligt teoretisk interesse, men kan ogsaa tænkes at kunne faa praktisk betydning, hvis man f. eks. vil dyrke gær paa en særlig hensigtsmæssig maade med fremstilling af stærkt potente B-vitaminpræparater for øje.

I. Kapitel.

HISTORISK OVERSIGT OG VALG AF METODE.

1. *Kort gengivelse af de vigtigste historiske begivenheder indenfor B-vitaminforskningen.*

Indtil kort før aarhundredskiftet eksisterede kun faa spredte iagttagelser og forsøg, der har været af betydning for den moderne vitaminforsknings udvikling. Først Eijkmans klassiske og grundlæggende undersøgelser fra 1897 spredte lys over et fænomen, som man gennem nogen tid havde staaet uforstaaende overfor, nemlig sygdommen beri-beri's store udbredelse og tiltagen; gennem disse eksperimenteres klarhed skabtes grundlaget for med held at kunne arbejde videre paa mange hertil knyttede problemer. Eijkman havde som læge i Hollandsk Indien haft lejlighed til at iagttage, at sygdommen beri-beri havde en stor udbredelse i fængslerne. Han viste, at denne lidelse stod i forbindelse med kostens indhold af polerede ris, idet han for at udforske sygdommen eksperimenterede med kosten i forskellige fængsler. Det viste sig, at blandt hver 10.000 fanger, der fik kost væsentlig bestaaende af upolerede ris, fik kun een fange beri-beri, medens der paa samme antal fanger, som fik kost med polerede ris, opstod 3900 tilfælde af beri-beri. Endvidere lykkedes det Eijkman eksperimentelt hos høns og duer ved udelukkende fodring med polerede ris at fremkalde en sygdom, som han kaldte polyneuritis gallinarum. Sygdommens symptomer mindede om dem, man fandt hos beri-beripatienterne og opstod ikke eller helbredtes, hvis man gav fuglene upolerede ris. Tidens almindelige sygdomsopfattelse tvang imidlertid Eijkman til af sine forsøg at slutte, at en stivelsereg kost som ris fremkaldte en fordøjelsesanomali, hvorved der opstod resorberbare nervegifte i mavetarmkanalen, der atter kunde neutraliseres af stoffer i risskallerne. Senere

ændrede Eijkman denne hypotese, idet han klart slog fast, at der i risskaller findes et stof, hvis mangel forårsager ernæringspolyneuritis. Eijkman er saaledes den første, der eksperimentelt har fremkaldt det, man nu kalder en avitaminotisk sygdom, ligesom han længe førend udtrykket vitamin var foreslaaet, havde paavist forekomsten af et antineuritisk stof forskelligt fra almindeligt kendte nødvendige fødemidler og dog nødvendigt for normal ernæring.

Funk, der arbejdede med koncentration af dette antiberi-beri stof i ekstrakter fra risskaller, mente 1911, at det var lykkedes ham at renfremstille selve dette stof, idet han havde opnaaet et krystallinsk produkt, som kurerede due-polyneuritis i doser paa omkring 20 mg. Han anbefalede i 1912 i sit arbejde: mangelsygdommens ætiologi at kalde stoffer med samme virkning som denne antineuritiske substans for vitaminer, idet han forudsagde, at man snart vilde finde andre substanser, som stod i samme forhold til andre mangelsygdomme, som dette antiberi-beri vitamin til beri-beri og eksperimentel polyneuritis.

Hopkins, som analogt med adskillige tidligere forskere arbejdede med rensede kostformer, bekræftede, hvad mange før ham havde vist, at en kost bestaaende af rensed protein, fedt, kulhydrat, salte og vand er utilstrækkelig som ernæring for voksende rotter. 1912 publiceredes hans klassiske forsøg, som med kurver findes gengivet i enhver almindelig haandbog om vitaminer; disse forsøg viste, at tillæg af mælk til en saadan kost tillod dyrene at trives normalt. Han klarlagde, at der i naturlig føde, saasom mælk, findes et eller flere alkoholopløselige stoffer, som ikke tilhører de ovenfornævnte forskellige, nødvendige fødematerialer, som kræves for at opnaa normal trivsel hos rotter.

Efter de af Mc Collum og Davis i 1913 og Osborne og Mendel samme aar publicerede forsøg, der tydede paa tilstedeværelsen af et fedtopløseligt vitamin, viste Mc Collum og Davis 1915, at opnaaelsen af normal rottevækst kræver 2 faktorer, hvorefter den ene er vandopløselig, den anden fedtopløselig; meget hurtigt gjorde den opfattelse sig gældende, at den vandopløselige faktor paa grund af lignende udbredelse som Eijkmans antineuritiske substans skulde være identisk med denne, og senere forsøg har

sandsynliggjort dette, saaledes at man i vitaminforskningen regner dette for fastslaaet. Endelig 1916 foreslog Mc Collum og Kennedy navnet B-vitamin for dette vandopløselige, antineuritiske princip.

Dette er i korthed de vigtigste historiske data i B-vitaminets udvikling indtil aarene omkring 1920. Navnlig i den følgende tid, men dog ogsaa tidligere, pegede talrige forsøg i retning af, at det antineuritiske vitamin ikke alene er i stand til at holde fugle paa poleret riskost paa en bestemt vægt, idet man i adskillige naturlige fødemidler fandt forskellig fordeling af principper med antineuritisk virkning og vægtvedligeholdelsesvirkning. Saadanne resultater er bl. a. opnaaet af Schaumann 1911, Cooper 1912 og Chick og Hume 1917—1919. Yderligere iagttagelser over saadanne ernæringsnødvendige faktorer for fugle, spec. duer er sket gennem arbejder af Williams og Waterman 1927—1928 og af Carter, Kinnersley og Peters 1930. De første af disse forff. viste, at duer, der fik polerede ris, tog af i vægt selv efter tillæg af et B-vitaminpræparat med god antineuritisk virkning, hvor B-vitaminet var adsorberet til fullerjord (en jordart, indeholdende en stor mængde aluminiumsilikat); tillæg af gær gav derimod god vækst, hvorimod autoklaveret gær ikke havde denne virkning. Dette viste, at man i gær maa regne med tilstedeværelsen af en ernæringsfaktor forskellig fra antineuritisk vitamin, nødvendig for normal dueernæring. Man har senere vist, at denne faktor er forskellig fra andre kendte vitaminer (A, B_{II}, D og E); den kaldes nu ofte vitamin B_{III} (Williams og Watermans duefaktor); den findes foruden i gær navnlig i hvede og hvedekim.

Carter, Kinnersley og Peters saavel som Williams, Waterman og Gurin sandsynliggjorde ved særskilte forsøg publicerede 1930, at endnu en faktor, nu benævnet vitamin B_V, er af betydning for normal duevækst. Den adsorberes sammen med antineuritisk faktor af fullerjord, hvorved den adskiller sig fra B_{III}-vitaminet, men er forskellig fra B_I (og B_{IV}) ved at være forholdsvis stabil overfor paavirkning af alkalier. Til slut skal det omtales, at Carter (1930), der arbejdede med duer paa en kost bestaaende af polerede ris, iagttog, at disse fik en arythmi paa basis af en udviklet heart block. B_I-, B_{II}- og B_{IV}-vitamin helbredte eller fore-

byggede ikke denne arythmi, medens dette var tilfældet med gær og helhvede. Denne faktor viste sig at være termolabil.

Noget lignende stillede forholdet sig med hensyn til rotters vækst. Paa grundlag af en lang række overvejelser beskæftigende sig med tidligere førte argumenter angaaende identiteten af antineuritisk faktor og vækstfaktor for rotter kom Mitchell 1919 til det resultat, at man indtil det modsatte blev bevist, havde god grund til at betvivle disse stoffers identitet. For at afgøre spørgsmaalet absolut, maatte der foretages kvantitative undersøgelser, hvor det samme stof prøvedes for saavel vækstfremmende som antineuritiske egenskaber.

1921 fremkom fra Funk og Dubins side en ganske kort publikation af største interesse. De opnaaede en adskillelse af 2 vitaminer af B-typen ved adsorption paa norrit. Store mængder doseret af hvert af disse præparater alene fandtes utilstrækkelige for opnaaelsen af rottevækst paa en kost sufficient i alle retninger undtagen med hensyn til B-vitamin, medens rotter voksede godt paa smaa mængder af dem begge.

Smith gjorde i 1926 en iagttagelse af stor værdi, idet han ved at undersøge kostmanglers indflydelse paa eksperimentel tuberkulose hos hvide rotter, ikke formaaede at faa disse dyr til at vokse paa en kost, som han paa forhaand antog for sufficient, nemlig adækvat mængde kasein, salte, A-vitamin samt havre (som man fra dueforsøg vidste indeholdt B-vitamin i stor mængde). Tilskud af smaa mængder autoklaveret gær, som ikke indeholder antineuritisk vitamin, gav god vækst hos dyrene. Gennem dette og flere andre forsøg konstateredes nødvendigheden for rotter af 2 B-vitaminfaktorer, hvoraf den ene og ny viste sig at være varmestabil, (publiceret 1926 af Smith og Hendrick).

Seidell, der i 1926 bekræftede disse forsøgsresultater, idet han anvendte et antineuritisk koncentrat som B-vitaminkilde, viste samtidig, at kun rotter, men ikke duer, krævede saavel den antineuritiske som den varmestabile faktor (autoklaveret gær) til opnaaelsen af normal vækst.

Allerede Funk havde i 1912 antydnet muligheden af, at sygdommen pellagra skyldtes en kostinsufficiens af avitaminosenatur. Gennem storstilede, højst interessante og epokegørende eksperimenter tildels foretaget i majsdistrikterne i Amerika, ud-

ført i aarene 1914—1916 af Goldberger med vekslende medarbejdere, syntes dette tilfulde bekræftet. Da disse undersøgelser er grundlæggende for opfattelsen af B₁₂-vitaminets betydning ved denne sygdom, skal Goldbergers undersøgelser her refereres noget udførligere end de tidligere omtalte arbejder.

1915 lykkedes det Goldberger, Waring og Willettes at sammensætte en kost, som kurerede pellagra; denne føde var ret kostbar, og hvad der var den virksomme bestanddel, vidste man ikke. Fra 1918 fortsattes forsøgene paa Georgia State Sanatorium, hvor man paa patienter med pellagra prøvede en mængde forskellige næringsmidler. En del af disse viste sig saavel forebyggende som kurativt uvirksomme, derimod fandtes effekt af sødmælk og kasein. Chittenden og Underhill havde i 1917 fremkaldt en sygdom hos hunde ved hjælp af en bestemt slags kost. Denne sygdom, som efter et af symptomerne benævnedes »black-tongue«, mindede i mangt og meget om pellagra hos mennesker, hvorfor forff. ansaa disse lidelser for identiske. Det lykkedes Goldberger og Tanner at vise, at gær kurerede denne »black-tongue«, hvorfor de forsøgte gærdosering ved behandlingen af menneskepellagra med god kurativ virkning. Da gær kun indeholder lidet protein, mente man ikke, at det var proteinet i gæren, men et andet stof, der var virksomt. Ved tidligere foretagne studier (1924) var fastslaaet, at vitaminerne A, B, C og D samt mineralsalte var uvirksomme som antipellagramidler. Gær syntes saaledes at indeholde en faktor, der forhindrede eller kurerede pellagra; denne benævnedes P-p faktor (pellagra preventive). Dette resultat var naaet i 1925.

Goldberger, Wheeler, Lillie og Rogers publicerede 1926 en række interessante iagttagelser. Deres P-p faktor fandtes ikke i smør, derimod i gær og magert kød. Som yderligere sandsynliggørelse af, at »black-tongue« og menneskepellagra virkelig er identiske, anførtes, at de samme stoffer, der virkede kurerende paa den ene lidelse, helbredte den anden, og omvendt var de midler, der ingen indflydelse havde paa den ene sygdom, uvirksomme overfor den anden. Endvidere lykkedes det at vise, at unge rotter, som fik en basalkost befriet for B-vitamin, men iøvrigt sufficient, ikke voksede, naar de fik tillæg af autoklaveret gær, hvori B₁₂-vitaminet var ødelagt; de tabte i vægt, og hos

nogle optraadte før døden polyneuritiske symptomer. Hvis man i stedet for autoklaveret gær gav dyrene alkoholisk ekstrakt af majsmel, tog dyrene ligeledes af i vægt, og i løbet af et tidsrum ikke under 7 uger begyndte nogle af dyrene at faa konjunktiviske tilfælde med sammenklistrede øjenlaag; senere optraadte haaraffald paa hovedet med dermatitis paa ører, hals, bryst og poter skarpt begrænset og bilateralt symmetrisk. Erstattedes majsmel-ekstraktet med Seidells aktiverede fullerjord som B-vitamin-præparat, virkede dette paa samme maade som ekstraktet. Gav man derimod en ringe mængde af begge dele — majsmel-ekstrakt og autoklaveret gær — voksede dyrene normalt og frembød intet sygeligt. Forff. havde altsaa vist, at der til opnaaelse af normal rottevækst kræves 2 faktorer: den ene B-vitaminet det antineuritiske vitamin; den anden en faktor, som findes i autoklaveret gær, og som forhindrer resp. kurerer en lidelse hos rotter, der opstaar, naar denne mangler; symptomerne minder noget om symptomerne ved menneskepellagra. Saavel »black-tongue« hos hunde som pellagra hos mennesker kureres ligeledes af denne faktor. Der er saaledes leveret et sandsynlighedsbevis for, at rottedermatiten opstaaet paa grund af manglende P-p faktor er identisk med menneskepellagra. Denne faktor benævnes senere B_{II}-vitamin (eller G-vitamin af en del amerikanske forskere).

Goldbergers iagttagelser bekræftedes snart af talrige forskere, hvoriblandt maa nævnes Chick og Roscoe (1927), Sherman og Axtmayer (1927), Salmon, Guerrant og Hays (1928) samt Randoin og Lecoq (1927). Hunt (1928) og endvidere Williams og Lewis (1930) angav 3 forskellige faktorer i gær nødvendige for normal rottevækst. Disse sidste forsøg skal senere omtales nærmere. Endelig har Reader (1929—30) udskilt endnu en faktor fra gærekstrakt; denne, der først kaldtes vitamin B_{III}, er nu kendt under betegnelsen vitamin B_{IV}; dette er ligesom B_I-vitaminet alkali- og termolabilt.

Endnu en gærfaktor, den saakaldte Y-faktor, er paavist 1930 af Chick og Copping. Denne findes i alkalibehandlet, autoklaveret gær, men ikke i hønseæggehvide, som kun indeholder B_{II}-vitamin. Den er altsaa termo- og alkalistabil og er foruden i gær paavist i æggeblomme, hvedekim og oksekød.

Talrige koncentreringsforsøg med disse B-vitaminer er i tidens løb foretaget. Krystallinske produkter med overordentlig

potenseret B_I-vitaminvirkning udvundet af ekstrakter af ris-skaller eller gær er fremstillet bl. a. af Jansen, Windaus og Peters de senere aar.

Kuhn, György og Jauregg har fornylig sandsynliggjort B_{II}-vitaminets identitet med en gruppe plantefarvestoffer de saakaldte flaviner og fremstillet disse stoffer krystallinsk, og endelig har Reader ved rensning og koncentrering opnaaet et krystallinsk produkt med stærk B_{IV}-virkning. For B_I- og B_{IV}-krystallernes vedkommende er man imidlertid endnu næppe naaet til de kemisk rene vitaminer, idet B_I-krystallerne viser B_{IV}-aktivitet og B_{IV}-krystallerne B_I-virkning, og B_{II}-vitaminets identitet med flaviner trænger endnu til yderligere uddybning og bekræftelse fra andet hold. De andre nævnte vitaminer er det endnu ikke lykkedes at koncentrere endsige at isolere, saaledes at deres eksistens endnu ikke kan betragtes som endeligt bevist.

Det skal her bemærkes, at man hos mennesker ikke kender nogen lidelse, som menes at staa i forbindelse med mangel paa gærfaktorerne B_{III}, B_{IV}, B_V eller Y-faktor.

Man maa altsaa foreløbig regne med 6 stoffer af vitaminnatur indenfor B-vitaminkomplekset:

	Rotte	Due	varme-labil	varme-stabil	alkali-labil	alkali-stabil
B _I -vitamin } Eijkman }	+	+	+	÷	+	÷
B _{II} -vitamin } Goldberger }	+	÷	÷	+	+	÷
B _{III} -vitamin } Williams & Waterman }	÷	+	+	÷	+	÷
B _{IV} -vitamin } Reader }	+	÷	+	÷	+	÷
B _V -vitamin } Carter, Kinnersley } og Peters }	÷	+	÷	+	÷	+
Y-faktor } Chick og Copping }	+	÷	÷	+	÷	+

2. *Kvantitativ B-vitaminbestemmelse.*

Kort historisk udvikling.

Fra 1897, da Eijkman konstaterede eksistensen af antineuritisk vitamin, der er nødvendigt for duer, indtil 1916, da Mc Collum og Kennedy viste dettes sandsynlige identitet med det for rotter vandopløselige B-vitamin, foretoges alle B-vitaminbestemmelser kvalitativt som kvantitativt paa fugle, mest duer, men ogsaa høns, kyllinger, risfugle o. a. er dog anvendt. (Denne identitet mellem antineuritisk faktor for duer og rotter kan ikke siges at være absolut definitivt bevist, men mange forsøg foretaget i dette øjemed tyder herpaa, og indtil det modsatte er bevist eller sandsynliggjort, maa man have lov til at gaa ud fra rigtigheden heraf. Forsøg af Kinnersley, Peters og Reader (1930) samt resultaterne fra Londonkonferencen 1931 taler afgjort i denne retning. De samme substanser, som kurerer duepolyneuritis, har altid vist sig at kurere rottepolyneuritis og omvendt og giver ligeledes vægtforøgelse hos begge slags dyr, forudsat, at sufficient mængde af andre nødvendige B-vitaminfaktorer er til stede.) I tiden mellem 1916 og 1926 er saavel duer som rotter anvendt i dette øjemed, og endelig i den følgende tid fra 1926, da Goldberger og medarbejdere fastslog forekomsten af den saakaldte P-p faktor, det senere B₁₂-vitamin, er undersøgelser ved B₁-vitaminbestemmelser af nogle stadig udført paa duer, af andre paa rotter (eller mus), medens man til B₁₂-vitamineksperimenter altid har anvendt rotter.

Endvidere har forskellige nærmest kvalitative metoder, som nu fuldstændig er forladt, været anvendt i kortere perioder; det drejer sig bl. a. om visse farvereaktioner for B-vitamin angivet af Funk (1913) og Jendrassik (1923). Senere undersøgelser har imidlertid vist, at disse prøver ikke er specifikke, hvorved de mister deres værdi. Desuden har Spruyt (1930) angivet en kolorimetrisk metode til B₁-vitaminbestemmelser i risprøver baseret paa reduktion af fosforwolframsyreopløsning. Metoden er efterprøvet af Acton, Ghosh og Dutt (1932—1933), men da farvebestemmelsen ikke altid synes at løbe helt parallelt med fodringsforsøg, og da prøven er besværlig at udføre, kan den næppe tilraades.

Endelig skal nævnes, at Kinnersley og Peters i 1934 kort før afslutningen af dette arbejde har offentliggjort en farvereaktion for B₁-vitamin. Prøven er en modificeret Pauly-reaktion, hvor modifikationen bestaar i en vilkaarlig ændring af pH samt tilsætning af formalin. Denne metode egner sig imidlertid ikke til almindelig kvantitativ analysebrug, men kan kun anvendes, hvor man arbejder med stærkt rensat B₁-vitamin som under koncentreringsforsøg ved forskellige fraktioneringer. Da prøven langt fra er specifik, bør den kun finde anvendelse som en hurtig metode til orientering ved koncentreringsforsøg, hvor den til gengæld kan yde betydelig hjælp navnlig i form af tidsbesparelse. Sammenlignende forsøg mellem kvantitative kolorimetriske bestemmelser paa denne maade og maaling af aktiviteten ved helbredelsesforsøg paa duer viser oftest god overensstemmelse mellem begge prøver.

Williams har i 1919 foreslaaet en metode, hvor vækstintensiteten af gær dyrket i syntetisk B-vitaminfrit substrat, hvori denne ikke formaar at trives normalt, anvendes som indikator. Metoden er gennemprøvet og modificeret af en del forskere (f. eks. Bachmann 1919, Eddy og Stevenson 1920, Funk og Dubin 1920, Swoboda 1920 samt Euler og Petterson 1921), men senere, da det lykkedes at adskille en gærvækststimulerende faktor, det saakaldte »bios« fra B-vitamin, som gæren ikke behøver for at kunne trives, maatte denne metode atter forlades paa grund af manglende specificitet.

Ikke alene for trivseln af pattedyr og fugle, men ogsaa for en del lavere staaende væsener, er B-vitaminet nødvendigt; saaledes har Harden og Zilva i 1920 paavist B-vitaminets betydning ved haletuders udvikling og frøers vækst; Loeb, Northrop, Baumberger samt Bacot og Harden (1915—1922) har ved forsøg med bananfluen (*drosophila*) konstateret nødvendigheden af B-vitaminets forekomst i disses føde, hvis normal udvikling skal finde sted; Uyei (1927) har demonstreret det analoge forhold ved dyrkning af tuberkelbaciller og endelig har Sweetman og Palmer i 1928 angivet en prøve, som angives specifik for tilstedeværelsen af B-vitamin, hvor melbillens (*tribolium confusum* Duval) forpupningstid er kriterium herfor. Metoden, der ikke synes at have vundet indpas, angives af forfatterne at være føl-

som ovenfor $1\frac{1}{2}$ % forandring af teststoffet. For nylig (1933) har Mc Coy vist, at kakerlaken (*blatta germanica*) kræver B-vitamin for at trives normalt.

En skønsmæssig kvantitativ metode er anvendt af Cramer og Mottram (1927). Den bestaar i ved hjælp af teststoffet at forsøge paa at gengive B-avitaminotiske rotter med temperaturfald normal temperatur; sker dette inden 2 uger, tales om »complete recovery«, efter 2 uger »slow recovery«; sker dette slet ikke, tales om »no recovery«. At denne metode kun kan give et fingerpeg i retning af kvantitativ B-vitaminbestemmelse er indlysende, hvorfor den ej heller har vundet udbredelse.

Undersøgelser foretaget af Peters og medarbejdere 1932 og senere har vist, at hjernevæv fra polyneuritiske duer har formindsket evne til at ilte mælkesyre; in vitro forsøg med tilsætning af Br-vitamin gengiver hjernevævet normal funktion i saa henseende. Forsøgene er bekræftede fra forskellig side, bl. a. paa hundehjerner in situ og in vitro; en nærmere udformning vil maaske kunne føre til en kvantitativ metode til bestemmelse af Br-vitamin.

De forskellige fremgangsmaader til B-vitaminbestemmelse, hvortil enten duer eller rotter, der almindeligvis regnes for de mest egnede forsøgsdyr, har været anvendt, skal her gøres til genstand for en udførligere omtale, idet bedømmelsen af vort eget arbejde og den her valgte teknik i høj grad er afhængig af et grundigt kendskab til disse.

A. Duer.

Som tidligere omtalt kendes i det mindste 3 forskellige B-vitaminfaktorer nødvendige for duer, nemlig de saakaldte Br, B_{III} og B_V. De 2 sidstes betydning for mennesker er ikke kendt og biologiske kvantitative maalemetoder for disse er ikke beskrevet.¹⁾

Symptomerne ved Br-vitaminmangel hos duer er først beskrevet af Eijkman, senere af talrige andre forskere, hvoriblandt navnlig maa fremhæves: Grijns (1901), Braddon (1907), Schau-

¹⁾ Samtidig med dette arbejdes afslutning har O'Brion dog beskrevet en fremgangsmaade til B_{III}-bestemmelser paa duer.

mann (1910), Mc Carrison (1919), Findlay (1921), Funk (1922), Kon og Drummond (1927), Kruse og Mc Collum (1929) og Peters (1930). Diarrhoe er ofte første kliniske manifestation — derefter bliver fjerene pjuskede, medens hovedet holdes lavt mellem skuldrene; siden optræder forskellige paralytiske polyneuritiske symptomer, begyndende i tærnes fleksorer efterhaanden strækkende sig opad; af og til ses hængende vinger. Det symptom, der for vort formaal er hovedsymptomet, er bagoverbøjning af hovedet opistotonus, der skyldes paralyse af de forreste halsmuskler; undertiden ses et andet fænomen emprostotonus, foroverbøjning af hovedet. Under disse symptomers udvikling kommer appetitmangel og stærkt vægttab. Forskellige cerebellare ligevægtsforstyrrelser ses hyppigt. De patologisk anatomiske forandringer skal her ikke omtales. Disse forskellige symptomer udvikles dog ingenlunde konstant hos duer, som man giver en B-vitaminfri kost, f. eks. polerede ris. Opistotonusstillingen af hovedet, uden hvilken de senere omtalte kurative forsøg ikke kan udføres, angives saaledes kun at indtræffe hos ca. 45 % af duer paa B-vitaminfri kost. (Peters, Coward).

Den oprindelige anvendte metode, den saakaldte *præventive prøve* gaar ud paa at bestemme den mindste dosis af teststoffet, som hindrer, at polyneuritiske symptomer hos duer, der faar polerede ris, udvikles. Allerede Eijkman brugte denne fremgangsmaade; men den første, der i noget større stil foretog kvantitative bestemmelser efter dette princip, var Cooper (1912—14). Senere har denne prøve været anvendt af talrige forskere, hvoriblandt skal nævnes Vedder og Clark (1912), Williams (1916, 1917), Chick og Hume (1917) samt Jansen og Donath (1926).

Williams og Seidell angiver 1916 en prøve, hvis formaal er bestemmelsen af den mindste mængde teststof, der er nødvendig til at vedligeholde vægten hos duer, der faar B-vitaminfri kost, den saakaldte *vægtvedligeholdelsesmetode*. Denne er i de senere aar navnlig anvendt af Block, Cowgill og Klotz (1931), dog kombineret med den *kurative prøve*.

Denne sidstnævnte prøve — den kurative prøve — er i sin moderne form navnlig sat i system og anvendt af Kinnerley, Peters og Reader (1928); polyneuritiske duer anvendes; tid-

ligere bestemtes den minimumsdosis, der kræves til helbredelse af opistotonus; denne minimums kurative dosis er imidlertid vanskelig at bestemme ved praktiske forsøg, da forskellige duer reagerer forskelligt overfor samme dosis. Da forfatterne imidlertid har vist, at dosis størrelse staar i en vis relation til helbredelsens varighed, anvendes prøven nu oftest paa den maade, at teststoffets styrke angives i dagsdoser, idet en saadan udtrykker den gennemsnitlige helbredelsestid for en række duer pr. g. teststof.

For nylig er angivet en ny modifikation af den kurative prøve omtalt i et meget udførligt arbejde af Coward, Burn, Ling og Morgan (1933). Da denne artikel har betydelig interesse for vort arbejde, skal den omtales nøjere. Forfatterne har ialt anvendt 688 duer i løbet af 31 maaneder; — disse fodredes alene med polerede ris og vand ad libitum. Hos 310 af disse duer udvikledes opistotonus inden 30 dage, og kun disse dyr anvendtes. Grunden til, at man sætter denne grænse, skyldes Peters paa-visning af, at polyneuritissymptomer, der optræder senere, ikke paavirkes af samme doser, som kurerer »head retraction« optraadt før den tid. Kinneresley og Peters anvender forskellige forsigtighedsregler saasom 1) fodring 20 dage (standardisering af duerne) med blandet korn, derpaa faar de 2) vaskede ris (opvarmede i 2 timer til 150°); 3) de 10 første dage lever fuglene i bure i fri luft, senere inden døre ved $10-15^{\circ}$ C. indtil opistotonus indtræder; 4) under den kurative prøve opholder dyrene sig ved 21° C. og endelig 5) prøves duerne med sukker-vand 4 timer førend egentlig testdosering foretages; alt dette sker for at undgaa tilfælde af spontan eller uspecifik helbredelse, som man kender eksempler paa. Disse forskellige forsigtighedsregler undlades her, og det viser sig, at den mængde duer, der faar opistotonus, nemlig 45 %, er den samme som i førstnævnte forfatteres materiale. Saa snart opistotonus er observeret, gives testdosis opslemmet i 5 cm^3 vand ved hjælp af en pipette og en gummisonde. Hvis »head retraction« er forsvundet inden 24 timer, men kommer igen inden 48 timer, regnes kureringens varighed for en dag. Symptomfrihed over 48 timer, men under 72 timer regnes for 2 dages kurering, o. s. fr. Kun een dosis administreres til hver due, selv om denne er uden effekt. Forfatterne

viser, at udregning af teststoffets vitaminmængder giver samme resultat, hvad enten man foretrækker at anvende duer med 1 eller med 2 dages kurering, ligesom varigheden af »head retraction«, før duen anvendes, er uden indflydelse, naar dette blot sker inden 15 timer efter symptomernes indtræden. Til maaling af styrken anvendes til hver dosis mange duer, oftest 8—9, hyppigt flere. Coward og medarbejderes nye modifikation gaar ud paa i et koordinatsystem, hvori man med den procentvise mængde kurerede fugle som ordinat og dosis størrelse som abscisse gennem talrige forsøg med et standardpræparat har konstateret den karakteristiske kurve for polyneuritiske duers reaktion overfor dosering af antineuritisk vitamin; ved hjælp af dette koordinatsystem finder man dosis relative størrelse, naar man kender antallet af kurerede duer %-vis, idet man opsøger det tilsvarende punkt paa abscissen. Disse punkter kan vælges arbitrært, saaledes f. eks. at 50 % kurering svarer til dosis 1,0. Heraf udregnes den relative potens i forhold til standardproduktets kurerende evne maalt paa samme maade. Forfatterne har undersøgt en del forskellige substanser dels med denne duemetode, dels ved hjælp af en rottevækstmetode, som senere skal beskrives, og materialet er bearbejdet statistisk. De finder derved, at rotter og duer giver væsentlig de samme resultater ved anvendelse overfor forskellige mængder international B₁-vitaminstandard samt overfor gæreksktrakter, medens prøver af torgær viser dobbelt saa store værdier, naar duer anvendes som testobjekt i stedet for rotter. Duemetoden angives at have en »sandsynlig fejl« (probable error) paa $+ 29 - \div 23$ %, medens rottemetodens »sandsynlige fejl« kun svinger fra $+ 6,1 - \div 5,5$ %, naar 9 dyr anvendes.

En del forskere giver deres forsøgsdyr en mere alsidig grundkost end polerede ris ud fra den overbevisning, at polerede ris er en insufficient kost med hensyn til flere andre essentielle fødebestanddele end B₁-vitamin, saaledes navnlig protein, salte og fedt. En med disse principer for øje modificeret kost er bl. a. anvendt af Simonnet (1920), Randoin (1923) og af Block, Cowgill og Klotz (1931), men da opistotonus alene skyldes mangel paa B₁-vitamin, har denne modifikation af grundkosten formentlig ingen betydning, hvor det drejer sig om den kurative metode.

B. Rotter.

Af forskellige faktorer indenfor B-vitaminkomplekset, som er nødvendige for rotter, kendes som tidligere nævnt 4, nemlig B_I, B_{II}, B_{IV} og den saakaldte Y-faktor, af hvilke de to sidste ikke har nogen kendt betydning for mennesker; nogen maalemetode for Y-faktoren kendes ikke. Rotter har været og bliver stadig anvendt til vitamin B-kompleksundersøgelser under eet samt til særskilte B_I, B_{II} og B_{IV}-vitaminundersøgelser. De hertil foreslaaede metoder skal i det følgende gennemgaas enkeltvis, idet her blot skal forudskikkes, at fælles for samtlige metoder kræves en passende B-vitaminfri grundkost, der med undtagelse af dette vitamin indeholder alle stoffer nødvendige for rotters ernæring i sufficient mængde. Angaaende detailler med hensyn til grundkosten skal henvises til senere afsnit i denne afhandling.

Fjerner man netop afvænnede rotteunger fra moderen og forsøger at opfostre dem paa en B-vitaminfri, men iøvrigt fuldstændig kost, vokser rotterne i kort tid, tager derpaa af i vægt og dør under stedse formindsket appetit i løbet af nogle uger. Giver man imidlertid paa det tidspunkt, da vægttabet er konstateret, tillæg af B-vitamin eller stoffer, der indeholder saadant, tager dyrene paa i vægt, og vægtforøgelsen staar i en vis relation til den administrerede mængde B-vitamin, saaledes at man i den mindste dosis, der giver normal vægtforøgelse, har et vist sammenligneligt maal for den doserede mængde B-vitamin som helhed. Denne prøve er oprindelig angivet af Mc Collum og Simmonds (1918). Senere har Sherman og Mc Arthur (1927) undersøgt forskellige forhold af betydning ved udførelsen og fundet, at hanner vokser bedre end hunner, og at en udtømningsperiode ikke er nødvendig; endvidere viser det sig, at større dyr tager mindre paa i vægt end mindre dyr af samme alder paa samme dosis. Dunham har i 1921 modificeret denne prøve saaledes, at man bestemte den mindste mængde teststof, som gav vedligeholdelse af vægt ($\pm 4\%$) i 30 dage hos rotter, der fik B-vitaminfri basalkost. Prøven egner sig særlig til at bestemme mængden af B-vitamin i stoffer, som kun indeholder lidt af dette. Man undgaar ligeledes ved denne metode at benytte sig af det tidligere anvendte begreb: normal rottevækst, som er et noget usikkert kriterium.

Da alle vitamin-B-kompleksets forskellige faktorer imidlertid har betydning for rottevækst, siger en prøve udført som ovenfor skitseret, hvis der kommer god vægtforøgelse, kun, at stoffet indeholder alle til rottevækst nødvendige faktorer, men ikke i hvilket forhold; hvis der ikke kommer vækst, kan man kun udtale, at een eller flere eventuelt alle B-faktorer mangler, men hvilke, det her drejer sig om, kan man sædvanligvis ikke slutte sig til. Naar prøven udføres paa nævnte maade, bliver vægtforøgelsen afhængig af den faktor, der forefindes i mindst mængde i testobjekt, saaledes at det bliver denne fraktions mængde, man maaler. Denne prøve har tidligere spillet en stor rolle, men efter at uddifferentieringen af de forskellige faktorer er sket, tilstræber man bestemmelsen af disses mængde enkeltvis.

Symptomerne ved B₁-vitaminmangel hos rotter er beskrevet af talrige forskere; det mest karakteristiske »symptom«, som rotter lidende af B₁-vitaminmangel frembyder, er utvivlsomt appetitmangel med deraf følgende vægtaftagen, idet det optræder hos 100 % af rotterne; endvidere er polyneuritis med spasticitet, kramper og lammelser et hyppigt, men senere optrædende fænomen. Den første, der har observeret paralyse af bagbenene (hos rotter, der fik autoklaveret hestekød), synes at være Schau-mann (1910—11). Drummond angav i 1917, at paralytiske symptomer kun udvikledes hos faa dyr, der faar B-vitaminfri kost, og hertil slutter sig nu alle, der har beskæftiget sig med disse spørgsmaal. Hofmeister viste i 1922, at partiel B-vitaminmangel ret hyppigt gav anledning til udvikling af ataksi med tremor og konvulsioner efterhaanden gaaende over i paralyse, og der er nu almindelig enighed om, at rotter, der faar en ringe subsufficient B-vitaminsindtagelse, lettere udvikler polyneuritiske symptomer end de dyr, der slet intet B-vitamin faar. Man har forklaret dette ved at antage, at de helt B-vitaminfri dyr dør, førend symptomerne faar tid til at udvikles.

Af Sandels (1929—30) beskrives polyneuritis hos rotter som flg.: et af de første symptomer er »head retraction« begyndende som et nervøst kast med hovedet senere udviklende sig til typisk konstant opisthotonusstilling; derefter optræder spastisk gang, der afløses af paralyse af bagbenene; der ses ofte kloniske kramper og tab af den muskulære koordination, naar dyrene tages

med hænderne eller drejes. Hyppigheden af symptomernes optræden er forskellig og afhænger som nævnt af Br-vitaminmængden i grundkosten; Sandels udtaler, at han formaar at fremkalde polyneuritis næsten konstant ved at give ganske smaa Br-vitaminmængder. Birch og Harris (1931) fandt, at 50 % af rotter blev polyneuritiske paa en næsten B-vitaminfri basalkost, men ellers finder man i literaturen ikke nøjagtige angivelser af hyppigheden, hvormed de polyneuritiske symptomer optræder.

De patologisk-anatomiske forandringer skal her ikke omtales.

I sin moderne form er den specielt til Br-vitaminbestemmelse beregnede rottevækstprøve udarbejdet af Sherman og Axtmayer (1927) og Chick og Roscoe (1929). I princippet, som senere udførligt skal omtales, gaar disse prøver ud paa at give rotter en fuldstændig basalkost, som indeholder B_{II}-vitamin samt ogsaa helst de mere ukendte fraktioner af B-vitaminkomplekset, der er nødvendige for rotter, nemlig B_{IV} og Y-faktor, men derimod intet Br-vitamin; en testdosis' vægtforøgende evne vil derfor afhænge udelukkende af dens Br-vitaminindhold. B_{II}-vitaminet gives oftest som gær eller gærekstrakter autoklaveret i længere tid ved højt tryk, hvorved man ødelægger den antineuritiske faktor, men lader en stor del af B_{II}-faktoren uskadt. De amerikanske forskere antager som Br-vitaminenhed den mængde teststof, som i en 4—8 ugers forsøgsperiode giver rotterne en gennemsnitlig vægtforøgelse paa 3 gram pr. uge, medens den engelske skole antager 10—14 gram tilvækst pr. uge i 5 uger som enhed.

Chase og Sherman har i 1931 givet en omhyggelig beskrivelse af deres metode; endvidere har for nylig Coward og medarbejdere (1933) foretaget sammenlignende undersøgelser med de samme stoffer, saavel ved hjælp af den tidligere omtalte due-metode, som den engelske skoles rottevækstmetode. Da disse undersøgelser er af særlig interesse for vort arbejde, skal de omtales nærmere.

Unge rotter, 55—70 gram, fik B-vitaminfri basalkost indeholdende autoklaveret gær som B_{II}-vitaminkilde; en initial vægtstigning paa 10—30 gram afløstes hurtigt af vægttab, og gav man intet Br-vitamintillæg, døde dyrene i løbet af 21—38 dage fra forsøgets begyndelse. Ved hjælp af varierende dosering af international Br-vitaminstandard gruppevis paa rotter kon-

struerede man dyrenes heraf afhængende væggtkurve i et koordinatsystem, idet doserne afsattes ud ad abscisseaksen og middelvægtforøgelsen i 3 uger op ad ordinataksen. 6 forskellige præparater undersøgtes saavel ved hjælp af denne metode som ved hjælp af den tidligere omtalte duemetode, som ovenfor nævnt, og styrken angaves i forhold til den internationale standard. Resultatet er tidligere omtalt og skal senere diskuteres.

Mitchell anbefaler 1933 som modifikation af rottevækstmetoden den saakaldte »paired feeding method« til kvantitativ Br-vitaminbestemmelse paa rotter. Den gaar i korthed ud paa at bestemme vitaminmængden i et teststof som den mindste koncentration af dette, der kan fremkalde maksimumvækst, idet teststoffet blandes i forskelligt forhold til basalkosten, som kun mangler Br-vitamin. Der bruges rotter, som anvendes parvis (ikke under 4 par til hver teststofdose); rotterne maa være af samme køn, omtrent samme vægt, samt helst af samme kuld. Til hvert par, som opholder sig adskilt, gives samme mængde grundkost, altid bestemt af den rotte, der spiser mindst. Den eneste forskel paa disse rotter er, at den ene af hvert par faar tillæg af en suffieient mængde koncentreret Br-vitamin daglig. Den testrotte, der ikke faar tilstrækkelig Br-vitamin gennem teststoffet til maksimal vægst, vokser altsaa ikke saa godt som sit følgedyr, hvilket man skal forsøge at opnaa.

Metoden anses for at være meget besværlig og tidsrøvende, saa meget des mere, som forfatteren forlanger kvantitative protein-, fedt- og kulhydratanalyser af hvert teststof, for at dette kan erstatte ækvivalente mængder af basalkosten.

Ligesom overfor duer kender man ogsaa en kurativ prøve anvendt paa rotter; ved hjælp af denne bestemmer man minimumdose af et teststof, som kurerer akutte tilfælde af polyneuritis; helbredelsens varighed angives at være afhængig af den doserede Br-vitaminmængde. Smith (1930), der bruger rotteunger, anvender en enkelt intravenøs injektion af testekstraktet og bestemmer den minimale kurative dosis; forfatteren angiver endvidere at have prøvet et stort antal forskellige stoffers indflydelse overfor helbredelse af polyneuritissymptomerne bl. a. pilocarpin, histamin o. s. v., men aldrig at have truffet tilfælde af uspecifik helbredelse. Kinnersley, Peters og Reader benytter

voksne rotter, som faar B₁-vitaminfri kost indtil polyneuritis indtræder, hvorpaa teststoffet gives pr. os, og helbredelsens varighed bestemmes. Jansen anvender en modifikation af Smiths metode paa rotter, hvis vægt er standset paa grund af B₁-vitaminmangel. Potensen af teststoffet, der gives pr. os, maaler man ved at undersøge dels den opnaaede maksimumsvægtforøgelse, dels det antal dage, hvor vægten holder sig over vægten paa doseringstidspunktet efter en enkelt dosering.

For nylig, umiddelbart før afslutningen af dette arbejde har Birch og Harris (1934) beskrevet og anbefalet en metode til B₁-vitaminbestemmelse paa rotter, der baseres paa det af Drury (1930) demonstrerede forhold, at B₁-avitaminotiske rotter har en langsom hjerteaktion, idet denne sættes ned fra det normale 500—550 til ca. 350 pr. minut. Birch og Harris viser, at dette indtræffer konstant hos rotter med B₁-vitaminmangel og kureres ved at give B₁-vitamin; aktionsforøgelsen og helbredelsens varighed er afhængig af B₁-dosis størrelse, og herpaa baseres metoden, ved hvilken hjerteaktionen bestemmes elektrokardiografisk. Denne »bradycardimetode« er blevet sammenlignet med en del andre prøver som rottevækstmetoden, den kurative prøve overfor rottepolyneuritis og duepolyneuritismetoden, idet man har undersøgt B₁-vitaminindholdet i den internationale standard for B₁-vitamin, en prøve af torgær, marmite og hvedekim. Alle metoder giver ret overensstemmende værdier, men rottevækstmetoden angives dog at være lidt mere følsom end de andre.

Symptomerne ved B₁₂-vitaminmangel hos rotter angives noget forskelligt af forskellige forfattere, men en del fælles træk forefindes. Goldberger og medarbejdere beskriver som de første en lidelse hos rotter »rottepellagra«, en dermatitisk tilstand, som udvikles, naar disse dyr bliver unddraget B₁₂-vitamin i kosten: denne antages af forfatterne at være den hos rotter med menneskepellagra analoge tilstand. Senere har en lang række forskere beskrevet denne lidelse: blandt disse skal særlig nævnes Chick og Roscoe (1927), Sherman og Sandels (1928—29 og 1931), Findlay (1928) samt Salmon, Guerrant og Hays (1928).

Her i landet er rottedermatitis først eksperimentelt fremkaldt og udførligt omtalt af Clemmesen (1932).

Vækststandsning, der altid indtræder ved komplet B₁₂-vitaminmangel, samt mere eller mindre symmetrisk dermatitis med haaraffald af ører og poter er karakteristisk; endvidere ses hyppigt blepharokonjunktiviter med inkrustation og sammenklæbning af øjenlaagene. En del symptomer saasom gangrøse forandringer, perioder med diarrhoe, blodige cystiter, stomatiter, endvidere karakterforandringer (irritabilitet, ondskafuldhed) er stærkt varierende beskrevet. De patologisk-anatomiske forandringer skal her ikke omtales. Foruden hos hunde (tidligere omtalt »black tongue«) er endvidere dermatitisagtige forandringer ved B₁₂-vitaminmangel beskrevet hos mus (Bing og Mendel 1929) og hos kyllinger (Kline, Keenan, Elvehjem og Hart 1933).

Dermatitisens hyppighed og grad angives uhyre forskelligt. Den optræder, naar dette i det hele taget sker, hyppigt indenfor 6—10 uger efter B₁₂-manglens begyndelse. Kun faa forfattere angiver hyppigheden med konkrete talangivelser; dette er dog tilfældet med Roscoe, der i 1933 for 7 forsøgsaars vedkommende har opgjort hyppigheden til 57 % beregnet paa ialt 191 rotter, der har faaet B₁₂-vitaminfri kost. I modsætning til Leader (1930), der finder, at rottedermatitis lettest lader sig fremkalde i foraarsmaanederne, angiver Roscoe, at tilfældene optræder jævnt fordelt hele aaret rundt og med lige stor hyppighed, hvad enten basalkosten indeholder spor af B₁₂-vitamin eller er fuldstændig rensat for dette, hvorimod Sherman og Sandels i lighed med det analoge forhold ved B₁-vitaminmangels forhold til polyneuritissymptomer ser flest tilfælde af rottepellagra, hvis dyrene faar minimale B₁₂-vitaminmængder i kosten.

I litteraturen hersker der almindelig enighed om, at dermatissymptomerne let lader sig kurere af B₁₂-vitaminholdige stoffer; disse giver samtidig vægttiltagen, saaledes at saavel den kurative som den vægtforøgende evne synes at være afhængig af dosis størrelse. (Se bl. a. Aykroyd og Roscoe 1929 samt Roscoe 1933).

Den kurative B₁₂-vitaminundersøgelse, der bestemmer den mængde af et teststof, der netop er nødvendig til at kurere rottedermatitis, er aldrig blevet anvendt i større stil. Derimod har

rottevækstmetoden ganske analog med den tilsvarende prøve tidligere beskrevet for B_I-vitaminets vedkommende kun med den forskel, at basalkosten her indeholder alle andre vitaminer end B_{II}-vitamin, fundet ret stor udbredelse. Den er oprindelig i principet angivet af Goldberger og medarbejdere (1926) og bestaar i at bestemme den mindste dosis af et stof, som bringer B_{II}-avitaminotiske rotter med vægtstandsning til at opnaa en bestemt vægtforøgelse i en bestemt tid. Mangfoldige B_{II}-fri B_I-vitamin-kilder har været anvendt og skal senere udførligere omtales. De amerikanske forskere med Sherman og Bourquin i Spidsen anvender hyppigst alkoholiske hvedeekstrakter i dette øjemed og sætter som enhed for B_{II}-vitamin den mængde teststof, som i en 4—8 ugers forsøgsperiode giver rotterne en gennemsnitsvægtforøgelse paa 3 gram pr. uge, medens den engelske skole sat i system af Chick og Roscoe bruger et B_I-vitaminkoncentrat oprindelig angivet af Kinnersley og Peters som B_I-vitaminkilde frit for B_{II}-indhold og sætter enheden som den mængde, der fremkalder 10—14 grams vægtforøgelse i en 5 ugers forsøgsperiode. Metoderne synes at virke godt, men større statistiske bearbejdelser af disse og deres nøjagtighed mangler endnu.

Medens man i literaturen ikke finder nogen metode angivet, hvorved mængdebestemmelsen af den saakaldte Y-rottefaktor kan udføres, har Reader (1930) foreslaaet og prøvet en saadan metode for den af hende selv paaviste rottefaktor B_{IV}. Forfatteren mener, at udtømningsperioden for denne faktor er meget lang, hvorved symptomerne, der bestaar i spasticitet, koordinationstab, svulne røde poter, etc. indtræder sent. Til den kvantitative bestemmelse anvendes voksne dyr, som har faaet lov at vokse paa en kost, der indeholder den netop nødvendige mængde B_{IV}-vitamin, men ikke overskud; naar derefter baade B_I- og B_{IV}-vitaminerne fjernes fra føden, faar dyrene polyneuritiske symptomer i løbet af 3—4 uger, hvorpaa man giver B_I-vitamin; symptomerne bringes derefter til at svinde med undtagelse af ovennævnte for B_{IV}-mangel karakteristiske: vægten stiger ikke, og døden indtræder inden 10 dage, hvis B_{IV} ikke gives. Doseres teststoffet nu, kan man af vægtforøgelsen aflæse dettes potens med hensyn til B_{IV}-vitamin.

Da det uomtvisteligt er en stor fordel, naar man arbejder med kvantitative B-vitaminbestemmelser, at have visse faste, konstante værdier at gaa ud fra, er det af umaadelig betydning, at man paa en international vitaminstandardiseringskonference i London sommeren 1931 traf beslutning om at vedtage — foruden en række standardprodukter for andre vitaminer — et bestemt vitamin-B₁-holdigt præparat, som havde vist sig som holdbart og særdeles potent, som international B₁-vitaminstandard. Præparatet, det saakaldt Jansen og Donaths »acid clay preparation«, er et vitamin B₁-holdigt fullerjordpræparat, som fremstilles a. m. Seidell ved at behandle et vandigt, surt ekstrakt af 100 kg risskaller med 3 kg fullerjord. Som enhed valgte man den antineuritiske virkning, som 10 mg af dette standardprodukt besidder, naar man som biologisk metode enten anvender profylaktisk eller kurativ prøve paa duer eller rotter.

Som grundlag for denne vedtægt ligger en lang række undersøgelser, som det her vil være interessant i korthed at gennemgaa.

Standardproduktet var, nogen tid før konferencen fandt sted, udsendt til en række forskellige laboratorier sammen med en prøve af tørret gær, en prøve af hvedekim samt en prøve af marmite (et kommercielt gærpræparat). Disse forskellige stoffer undersøgtes med forskellig teknik de forskellige steder, og deres B₁-vitaminstyrke angaves i forhold til det udsendte standardprodukt. Det opnaaede Resultat ses af følgende skematiske rede-
gørelse, hvor standardproduktets styrke er sat til 100:

	tørret gær	hvedekim	marmite
<i>Chick og Jackson:</i> rotter 40 g. 2—5 pr. dosis. kriterium: daglig minimumdosis til 10—40 g ugentlig vægtforøgelse efter B ₁ -vitaminfri forperiode.	15	7	9
<i>Birch og Harris:</i> rotter 50—70 g. 2—3 pr. dosis. kriterium: daglig minimumdosis til 10—20 g ugentlig vægtforøgelse. Aktiviteten = ugentlig vægtforøgelse divideret med dagsdosis.	19—20	7	9—10

	tørret gær	hvedekim	marmite
<i>Birch og Harris</i> : rotter 80 g. 3—11 pr. dosis. kriterium: helbredelsens varighed overfor polyneuritiske rotter (kramper): bedst 6—12 dage. <i>Dagsdosis</i> = dosis divideret med varigheden	18—20	6—7	7—8
<i>Birch og Harris</i> : polyneuritiske duer (30 %). kriterium: <i>kurativ dosis</i> = dosis divideret med varigheden.	18—9 mindre værdier ved stigende doser.		11—6
<i>Kinnersley og Peters</i> : polyneuritiske duer. kriterium: <i>kurativ dagsdosis</i> .	22—19	14	11
<i>Ling</i> : polyneuritiske duer (37 %). kriterium: helbredelsens varighed.	25		

Ved betragtning af disse resultaters gode overensstemmelse trods de forskellige metoder, der er anvendt, forstaar man kongressens ovennævnte beslutning om valg af det internationale standardprodukt. Præparatet har ved en del undersøgelser sidst af Chick og Jackson (1933) vist sig særdeles holdbart; det indeholder en betydelig mængde Br-, men næsten intet B₁₂-vitamin.

Som omtalt tidligere fandt Coward og medarbejdere ved sammenlignende undersøgelser over Br-indholdet i forskellige stoffer, foretaget saavel paa duer som paa rotter, at forsøg med disse sidste dyr ved vækstprøven angav Br-vitaminmængden i tørret gær til ca. halvdelen af de værdier, man fandt ved at anvende den kurative prøve paa duer. Dette fremgaar imidlertid, som vi har set, ingenlunde, naar tallene fra konferencens tabel sammenlignes, saaledes at det af Coward opnaaede resultat foreløbig staar ganske isoleret.

3. Diskussion og valg af metode.

I det foregaaende har vi gennemgaaet de i literaturen omtalte og i det hele almindeligt kendte metoder, der har været foreslaaet og anvendt ved kvantitative Br- og B₁₂-vitaminbestemmelser. Det vil maaske være praktisk for oversigtens skyld at

opstille disse skematisk, hvorefter deres egnethed til vort for-
maal skal drøftes.

- I. Prøver, som nu definitivt er opgivet. $\left\{ \begin{array}{l} \text{visse farvereaktioner.} \\ \text{gær- og bakterievækst.} \\ \text{visse lavere dyrs udvikling} \\ \quad \text{(frøer — insekter).} \\ \text{temperaturmaalingen.} \end{array} \right.$
- II. B₁-vitaminbestemmelser:
- A. Duer: 1) præventiv prøve.
2) vægtvedligeholdelsesprøve.
3) kurativ prøve: bestemmelse af
a) minimum kurativ dosis.
b) helbredelsens varighed.
c) antal kurerede duer (procentvis).
- B. Rotter: 1) kurativ prøve: bestemmelse af
a) helbredelsens varighed (voksne dyr)
b) helbredelsens varighed (unger). $\left. \begin{array}{l} \text{a) helbredelsens varighed (voksne dyr)} \\ \text{b) helbredelsens varighed (unger).} \end{array} \right\} \text{polyneuritis.}$
c) minimum kurativ dosis
d) helbredelsens varighed: bradycardi.
- 2) vægtforøgelsesprøve: bestemmelse af
a) den dosis, der giver en bestemt ugentlig vægtforøgelse.
 α) 3 gram (Amerika).
 β) 10—14 gram (England).
b) maksimalforøgelse efter en enkelt dosering.
c) vægtforøgelsens varighed efter en enkelt dosering.
- 3) vægtvedligeholdelsesprøve.
- III. B₁₂-vitaminbestemmelser:
- Rotter: 1) kurativ prøve: bestemmelse af mindste dosis, der kurerer dermatitis.
2) vægtforøgelsesprøve: bestemmelse af
a) den dosis, der giver en bestemt ugentlig vægtforøgelse.
 α) 3 gram (Amerika).
 β) 10—14 gram (England).
- (IV. B₁₂-vitaminbestemmelser:
- Rotter:
- Vægtforøgelsesprøve (voksne dyr).)

Vi kan med undtagelse af den for nylig af Kinnersley og Peters angivne farvereaktion, der som omtalt kan anvendes med fordel ved B₁-koncentreringsforsøg, straks se bort fra de prøver,

nævnt under I, da disse er ganske uegnede enten paa grund af manglende specificitet, manglende adskillelsesevne overfor vitamin-B-kompleksets enkelte komponenter eller disse prøvers ofte mere kvalitative end kvantitative natur. Vender vi os dernæst til B₁-vitaminbestemmelserne, ser vi, at det særlig er hertil, der har været foreslaaet en lang række forskellige metoder, navnlig foretrækkende duer eller rotter som testdyr. Betragter vi de forskellige prøver, hvor duer er anvendt, kan man straks udelukke een af disse nemlig vægtvedligeholdesesprøven som uegnet i den foreslaaede form, da opnaaelse af vægtvedligeholdelse hos duer af faktorer hørende til B-vitaminkomplekset foruden af B₁ tillige er afhængig af vækstfaktorerne B₁₂ og B₆, og disse er vanskelige at tage tilstrækkelig hensyn til, da det endnu ikke er lykkedes at koncentrere endsige isolere dem.

Som fordele ved brugen af duer som forsøgsdyr ved B₁-vitaminundersøgelser skal nævnes følgende: Man anvender netop det dyr, hvormed Eijkman paaviste det antineuritiske princip — det senere B₁-vitamins — forekomst og skulde saaledes være sikker paa identiteten af den faktor, man bestemmer, med Eijkmans originale princip. Endvidere angiver mange forfattere, der har arbejdet med duer som forsøgsdyr, at disse prøver er lette at udføre, duerne nemme at anskaffe og haandtere og kræver mindre pasning end rotter. Den kurative metode er desuden særdeles hurtig, idet besvarelsen, hvis mange fugle staar til disposition, kan afgives allerede i løbet af nogle dage.

Men der er desværre mange ulemper og mangler en del endog af særdeles alvorlig natur hæftet ved anvendelsen af duer. De polyneuritiske symptomer optræder ret lunefuldt, navnlig med hensyn til det tidspunkt, hvor de indfinder sig. Dette har betydning for saavel den præventive som for den kurative prøve. For den førstes vedkommende, fordi denne bliver meget langvarig, idet det bliver nødvendigt at vente meget længe, førend man kan afgøre, om polyneuritissymptomer vil optræde eller ej, da man har mange eksempler paa meget sen optræden af disse; endog en latenstid paa 100 dage er beskrevet. Bl. a. af den grund foretrækkes nu den kurative prøve hyppigst af de undersøgere, der anvender duer. Vi har tidligere set, at en af betingelserne for, at den kurative prøve kan virke nogenlunde nøjagtigt, er den, at

kun duer, hvor »head retraction« optræder inden tredivte dag, anvendes. Dette indtræffer imidlertid kun hos 30—50 % af duerne; resten af disse maa derfor kasseres, hvilket er uheldigt. Af andre ulemper skal nævnes, at man har beskrevet polyneuritis symptomer, som er opstaaet ved sult hos duer trods rigelig B-vitamin tilførsel. Endvidere kan spontan kurering opstaa, foruden at mangfoldige forskelligartede former for uspecifik kurering er beskrevet f. eks. ved varmepaavirkning, ved indtagelse af forskellige stoffer saasom glukose, histamin, pilokarpin, nitriter, thyroxin, cholin, injektion af destilleret vand o. s. fr. Nogle duer med tilsyneladende typiske polyneuritis symptomer kan endvidere vise sig at være ganske refraktære overfor paavirkning af B-vitamin. Graden af polyneuritis er desuden ofte vanskelig at bestemme. Da man for at opnaa blot nogenlunde ensartethed i resultaterne bør anvende en stor mængde dyr paa hver dosis og overholde de mange tidligere beskrevne forsigtighedsregler, kan prøven dog ikke siges at være særlig let, saa meget desto mere, som tvangsfodring med eller uden sonde ofte vil være nødvendig. En del stoffer med forholdsvis ringe B-vitaminindhold vil af sidstnævnte grund ikke kunne undersøges, i hvert fald ikke uden ekstraktion og koncentrering af B-vitaminet, hvilket forøger omstændeligheden og navnlig usikkerheden ved metoden. Som omtalt er den præventive metode af let forstaaelige grunde nu næsten overalt forladt, men med den kurative metode er der dog, som vi har set, opnaaet ret nydelige og konstante resultater, men dens nøjagtighed selv udført med de sidste af Coward og medarbejdere foreslaaede ændringer er dog ikke større end $\div 23 - + 29 \%$.

En vis mulighed for at forøge nøjagtigheden af duemetoderne foreligger teoretisk. Mere ensartethed kunde maaske opnaas, hvis man altid benyttede samme duerace opfostret paa ganske ens maade, saaledes at forsøget startedes med saa ens grundbetingelser som muligt (analogt med, hvad der er tilfældet overfor rotter ved disses anvendelse i samme øjemed) .

En indvending, man ser fremført, mod anvendelsen af rotter ved B-vitaminbestemmelser er usikkerheden ved med bestemthed at kunne afgøre, om det, man maaler hos rotter (vægtforøgelse eller helbredelse af polyneuritis symptomer), virkelig er virknin-

gen af det samme princip, som bestemmes ved dueforsøgene, nemlig Eijkmans antineuritiske duefaktor. Ganske vist taler talrige forsøg udført udtrykkelig i dette øjemed for denne antagelse, og Coward og medarbejderes tidligere omtalte fund angaaende rotters vanskelige assimilation af Br-faktoren fra visse gærpræparater staar foreløbig isoleret. Da man de sidste aar har haft en international, konstant standardkilde for Br-vitamin til disposition som grundlag for al sammenligning, og denne ved talrige forsøg har vist sig særdeles vel anvendelig, ved saavel due- som rotteforsøg, maa man, indtil der foreligger afgørende bevis herimod, være berettiget til at anvende begge slags dyr, duer saavel som rotter.

Som en mangel ved de metoder, hvor rotter bruges, maa nævnes for vægtforøgelsesprøvens vedkommende forsøgenes relative langvarighed, for de kurative prøvers vedkommende, hvor polyneuritissymptomernes udbredelse anvendes som kriterium, disse symptomers inkonstante optræden og vanskeligheden ved at gradere dem. Naar man arbejder med syge dyr, maa man endvidere erindre, at resorptionen fra mavetarmkanalen kan være forstyrret, hvilket kan tænkes at have stor betydning; dette gælder ved kurative forsøg saavel for duer som for rotter.

Af fordele bør først og fremmest nævnes vægtforøgelsesprøvens store nøjagtighed (i Coward og medarbejderes hænder fra $\div 5,5\%$ — $+ 6,1\%$), samt de kurative prøvers relative hurtighed. Pasningen af dyrene kræver en del arbejde, men er ingenhunde vanskelig: dyrene spiser selv, behøver ikke at sondefodres og kræver langt mindre plads end duer. Rottevægtforøgelsesprøven har vist sig nøjagtigere end de kurative rottemetoder, men staar som omtalt meget tilbage for disse i hurtighed. Vægtvedligholdelsesprøven har kun været foreslaaet ved B-vitaminkompleksbestemmelser en bloc, men vil muligvis i modificeret form med fordel kunne anvendes, naar teststoffet kun indeholder lidt B-vitamin.

Birch og Harris, der stærkt anbefaler bradycardimetoden, angiver som dennes særlige fordele flg.: den er 1) hurtig, 2) let, 3) sparsommelig (kun lidt teststof nødvendig; rotten kan bruges flere gange), 4) nøjagtig, 5) følsom (teststoffet behøver kun at indeholde spor af Br-vitamin), 6) kompliceres ikke af refektion

(da metoden paa grund af sin hurtighed afgiver svaret før refektionen naar at manifestere sig). Af ulemper angives kun een, nemlig nødvendigheden af anskaffelsen af en elektrokardiograf.

Mod de 3 første punkter er der intet at indvende; med henblik paa punkt 4 maa pointeres, at forfatterne selv angiver, at rottevækstmetoden er nøjagtigere, hvorfor denne altsaa i saa henseende bør foretrækkes frem for bradycardimetoden. Med hensyn til punkt 5 fremgaar det tydeligt af flere grafiske opstillinger fra nævnte arbejde, at tillæg til en B_I-vitaminfri basalkost af B_I-vitamin i form af den internationale standard i doser omkring enheden (0,01 g) næsten ingen indflydelse har paa pulsaktionen, hvorimod rottevækstmetoden reagerer med en god vægtforøgelse overfor denne dosis; heraf fremgaar tydeligt, at denne metode kræver mindre indhold af B_I-vitamin i teststoffet end bradycardimetoden for at kunne udføres. Med henblik paa punkt 6 skal bemærkes, at man, hvis man vil undgaa refektion, kan gaa 2 veje; enten kan man anvende sukker i stedet for stivelse i basalkosten, eller ogsaa kan man koge sin stivelse.

Da man, som vi har set, ved B_{II}-vitaminbestemmelser er afskaaret fra at benytte duer og her bør anvende rotter, er der noget vist umiddelbart tiltalende ved at anvende disse dyr paa ganske analog maade til bestemmelse af begge disse faktorer. Den kurative metode er ved B_{II}-analyser som omtalt aldrig blevet anvendt i større stil, men dog hyppigt nok til at have vist, at den kurative faktor synes at være identisk med den vækstfremkaldende faktor. Grunden til den sjældne anvendelse af denne metode maa utvivlsomt søges deri, at rottedermatitis optræder meget inkonstant og er meget vanskelig at gradere. Af alle foretrækkes altsaa nu vægtforøgelsesprøven, der synes at virke godt.

Talrige undersøgere har vist, at forsøgsdyrs B-vitaminkrav (B_I og B_{II}) er forskelligt ved varierende mængde kulhydrat, fedt og protein i kosten. Ved komparative B_I-vitaminbestemmelser spiller dette forhold formentlig mindre rolle, selv om forskellige laboratorier anvender forskelligt sammensat kost, idet man her skal sammenligne med en international standard. Men ved B_{II}-vitaminanalyser kan værdierne fra forskellige forskere, der anvender forskellig forsøgs kost, vanskeligere sammenlignes; dette

kan kun ske, hvis kosten er helt eller i hvert fald næsten af samme sammensætning, idet vægtforskelle da ikke naar at gøre sig gældende indenfor den forholdsvis korte forsøgsperiode.

Naar man paa basis af den her foretagne redegørelse skal vælge metode til B-vitaminbestemmelse, maa man først gøre sig klart, hvad man bør kræve af en saadan metode. Efter min mening bør den forene størst mulig nøjagtighed med en teknik, der ikke er saa besværlig, at den hindrer anvendelsen ved rutineundersøgelser. Selv efter fremkomsten for nylig af arbejder dels af Coward og medarbejdere, dels af Birch og Harris vil jeg ikke betænke mig paa at foretrække rottevægtforsøgsprøven som den, der bedst af alle de omtalte prøver opfylder ovennævnte betingelser, med begrundelse i den forudgaaende gennemgang og drøftelse af de forskellige metoder og disses ydeevne. Det er da ogsaa denne metode, der, som vi senere skal se, er gjort til genstand for nærmere gennemprøvning.

Ved B-kompleksundersøgelser paa universitetets hygiejniske institut har rottevækstmetoden altid været anvendt, hvorfor man før dette arbejdes paabegyndelse besad forholdsvis stor erfaring med denne prøve, samt med opdrætning af rotter, valg af grundkost, etc., og man har kun haft grund til at være tilfreds med denne. Det var derfor yderligere naturligt, da andre forhold ved gennemgang af literaturen ikke talte derimod, at vælge denne metode fortsat i modificeret form.

Forsøg paa at udarbejde kvantitative metoder til bestemmelse af andre faktorer indenfor B-vitaminkomplekset end B₁- og B₁₂-vitaminerne er ikke foretaget i dette arbejde, da man, som tidligere omtalt, ikke kender deres betydning for mennesker.

4. *Almindelige elementære krav ved B-vitaminundersøgelser paa rotter.*

Næsten overalt, hvor man foretrækker rotter som forsøgsdyr ved vitaminbestemmelser, anvender man nu albinorotter, der har vist sig særdeles passende til formaålet. Det er en stor fordel at opdrætte disse dyr selv, idet man kun da kan være sikker paa, at visse for forsøgsdyrenes ensartethed absolut nødvendige forhold bliver overholdt. Det, man bør tilstræbe, er gennem sin avlsdyrkost at give alle dyrene en saa ensartet udvik-

lingsperiode som muligt, saaledes at de enkelte individer, der starter til forsøg, begynder dette med saa smaa forskelligheder som eksperimentelt gennemførligt, navnlig med hensyn til vitamindepoter, for at forsøgsresultatet fra forskellige dyr paa samme régime skal variere minimalt. Dette er navnlig for A-vitaminets vedkommende undersøgt og stærkt paapeget herhjemme af Gudjonsson (1930). Omhyggelig pasning, f. eks. renlighed og regelmæssige maaltider samt nøje overvaagen af indtraadt graviditet og fødsel maa absolut gennemføres, det sidste navnlig for, at man kan være fuldstændig sikker paa, at ungerne netop har den ønskede alder.

De forskellige laboratoriers avlsdyrkost varierer betydeligt dels indbyrdes, dels gennem tiderne, men holdes i hvert fald gennem lange perioder af konstant sammensætning. Ungerne tages fra moderdyret, naar de har naaet en bestemt alder, oftest 4 uger eller 1 maaned gamle: i literaturen angives store vægtforskelle, naar man sammenligner rotteunger i denne alder avlet forskellige steder; allerede fra 3-ugers alderen er ungerne imidlertid i stand til fuldstændig at kunne klare sig selv. De anbringes nu enkeltvis i passende bure ved konstant temperatur (ca. 22° C.), foreløbig under ens betingelser. Burene bør være vidmaskede, galvaniserede tremmebure anbragt paa ben, saaledes at maskerne tillader fæces at falde igennem, hvilket hindrer rotterne i at faa fat i disse. Dette er af kapital betydning, thi Steenbock, Sell og Nelson har i 1923 vist, at rotter gennem fæces udskiller betydelig mængde B-vitamin, som de, naar de mangler dette i kosten, søger at skaffe sig ved koprofagi. Dette forhold er bl. a. nærmere undersøgt af Kennedy og Palmer (1928), Roscoe (1931) og Guerrant og Dutcher (1932). Page (1932—33) har endog for fuldstændig at hindre koprofagi iført sine forsøgsrotter et læder-aluminiumharnisk, hvorved forsøgsresultaterne ved kvantitative B-vitaminbestemmelser bliver mere regelmæssige, idet rotter trods tremmebure kan opøve sig i at faa fat i deres fæces, hvis de har brug for de i disse værende B-vitaminer, som ved eksperimentel B-vitaminmangel.

Af samme grund maa man sørge for at holde saavel bure som madskaale, vandglas, tillægsskaale etc. rene.

Den ideale fremgangsmaade ved sammenlignende forsøg med

rotter vilde være kun at anvende unger af samme kuld, køn og vægt. Da imidlertid forsøgene, for i saa høj grad som muligt at udelukke individuelle forskelligheder hos dyrene samtidig kræver, at adskillige udsættes for de samme betingelser, støder disse krav imidlertid paa en vanskelighed, som i hvert fald kun delvis kan overvindes. Det vil nemlig være praktisk umuligt at skaffe tilstrækkeligt antal dyr af samme kuld, køn og vægt til flere sammenlignende bestemmelser. Derfor maa man slaa af paa nogle af disse ideelle fordringer og særlig drage omsorg for altid at opnaa dyr af samme alder (eventuelt ogsaa af samme køn) og saa lade kuldet og vægten være varierende, naar dette ikke kan undgaas.

Basalkosten, som rotteungerne nu bliver tilbudt ad libitum, skal være fuldstændig sufficient i enhver henseende undtagen med hensyn til B-vitamin, som kosten ved disse forsøg ikke maa indeholde. Disse betingelser overholdes i det store og hele overalt, og trods ret store variationer de forskellige steder er princippet i basalkostens sammensætning altid det samme, nemlig at give en passende blanding af protein, fedt, kulhydrat, salte og vitaminer med undtagelse af B-vitamin. Som proteinkilde foretrækkes oftest kasein, som er et fuldstændigt proteinstof, indeholdende alle for normal rottevækst nødvendige aminosyrer. Som fedtstof anvendes smørfedt eller forskellige planteolier som jordnøddolie, olivenolie, bomuldsfrøolie o. a. Kulhydrat kan være glukose eller stivelser som majsstivelse eller risstivelse. Salte anvendes hyppigst i form af Mc Collums Saltblanding nr. 185 af følgende sammensætning: Natriumklorid 10,38 gram, magnesiumsulfat 32,70 gram, surt primært natriumfosfat 20,82 gram, surt sekundært kaliumfosfat 57,24 gram, surt primært calciumfosfat 32,40 gram, calciumlaktat 78,00 gram og ferricitrat 7.08 gram; en del andre saltblandinger har dog ogsaa været anvendt. Hvis der ikke gives smør som fedtkilde, maa man sørge for gennem passende levertrandosis at forsyne dyrene med tilstrækkelig mængde A- og D-vitamin. Da fedt, stivelse, salte og levertran ikke indeholder B-vitamin, er nogen rensning af disse ikke nødvendig. Derimod maa man rense sit kasein, idet endog rektificerede handelsvarer oftest indeholder smaa mængder B₁₂-vitamin. Angaaende kaseinrensning angives i den ret store literatur

adskillige metoder. Her skal kort omtales de metoder, der anbefales fra de 2 centre, der navnlig har beskæftiget sig med moderne kvantitative B_I - og B_{II} -vitaminbestemmelser, og hvis undersøgelser i denne retning har været banebrydende ved at sætte undersøgelserne i system, nemlig Sherman og medarbejdere (Spohn, Chase, Bourquin o. a.) fra Columbiauniversitetets kemiske laboratorium, U. S. A., og Chick og Roscoe fra Lister-institutet i London. De første her nævnte forfattere befrier kaseinet for B-vitamin ved 3 gange grundig ekstrahering og vaskning med 60 % alkohol og afsluttende vaskning med 90 % alkohol, medens man ved den engelske fremgangsmaade foretager langvarig (14 dage) vaskning med $\frac{1}{2}$ ‰ eddikesyre efterfulgt af 4 døgn ekstraktion i Soxleths apparat med svag eddikesur 50—70 % alkohol; derefter efterbehandles med 93 % alkohol og til slut tørring og ristning i 3 døgn ved 120° C.

Paa en saadan kost, der altsaa er sufficient i alle retninger undtagen med hensyn til B-vitaminer, som den mangler fuldstændig, og C-vitaminer, som rotter ikke kræver, tager dyrene hurtigt af i vægt og dør, hvis B-vitamin ikke doseres. Gives derimod en vis tilstrækkelig mængde ølgær (5—15 %) blandet i kosten, trives dyrene godt og vokser normalt. En saadan kost betegnes ofte som normalkost, dyrene benævnes normaldyr og kan ved prøverne anvendes som saakaldte positive kontroldyr.

For nu at udføre henholdsvis B_I - og B_{II} -vitaminbestemmelser maa man sørge for at give dyrene henholdsvis B_{II} (+ B_{IV} + Y-faktor) og B_I (+ B_{IV} + Y-faktor) i sufficient mængde, efter at vægtkurverne gennem faldende tendens har vist, at dyrenes B-vitamindepoter er udtømt; denne periode er den første del af den saakaldte forperiode. Naar rotterne nu faar ovennævnte tillæg, som enten kan gives særskilt eller tilblandet basalkosten, indtræder oftest en forbigaaende mindre vægtstigning, der imidlertid hurtigt afløses af et vægtfald; anden del af forperioden. Saa snart dette indtræder, kan teststoffet gives, og nu begynder den egentlige forsøgsperiode.

Vi skal nu se lidt nærmere paa, hvordan forskellige laboratorier har løst spørgsmaalet om den særskilte administrering af de forskellige faktorer indenfor B-vitaminkomplekset.

B_{II} -vitaminet, som maa gives til den B-vitaminfri basalkost

ved kvantitative B_I-vitaminbestemmelser, doseres hyppigst i form af gær eller gærekstrakter, som er befriet for deres B_I-vitaminindhold ved længere tids autoklaving. Sherman angiver følgende metode som effektiv: lufttørret, pulveriseret bagerigær anbringes i tynde lag i petriskaale og autoklaveres 5—6 timer ved 15 punds tryk (tiden noget varierende for forskellig slags gær), eller gæren blandes med 0,1 molar natriumhydroksydopløsning til en blød masse og autoklaveres i 6 timer ved 120° C., hvorefter gæren atter neutraliseres ved tilsætning af ækvivalent mængde saltsyre; derefter lufttørring ved stuetemperatur og pulverisering. Chick og Roscoe anbefaler autoklaving i 5 timer ved 120° C af et vandigt ekstrakt af vasket bryggerigær som en god B_{II}-vitaminkilde befriet for B_I-vitamin. Under autoklaveringen gaar foruden B_I-vitaminet samtidig en del B_{II}-vitamin til grunde, man regner sædvanligvis med ca. halvdelen af dette sidste. Ved de her omtalte procedurer dog med undtagelse af forholdet ved den alkalibehandlede gær, maa gæren antages at beholde sit indhold af Y-faktoren, som slutter sig til B_{II}-vitaminet ved sin termostabilitet. Ønsker man derimod at give B_{II}-vitamin uden Y-faktoren, kan man anvende hønseæggehvide, der kun indeholder B_{II}-vitamin, men ikke B_I eller Y-faktor. (Chick og Roscoe).

Medens saaledes tilskud af B_{II}-vitamin uden ledsagende B_I-vitamin ikke volder større vanskelighed, er det omvendte ikke saa let en sag. Goldberger anvendte, som allerede tidligere beskrevet, et 85 % alkoholisk ekstrakt af majsmeal som B_I-vitamin-tillæg; dette indeholder kun ganske lidt B_{II}-vitamin, da majsmeal i sig selv er en daarlig B_{II}-vitaminkilde, og B_{II}-faktoren er vanskelig opløselig i alkohol af høj koncentration. Sherman og Bourquin benytter en lignende fremgangsmaade overfor hvede, idet de har vist, at et 80 % alkoholisk ekstrakt af friskmalet hvede næsten ikke indeholder B_{II}-vitamin. Ekstraktet gives som afmaalt, koncentreret mængde, opsuget paa en saa stor mængde af basalkostens majsstivelse, at dosis af B_I-vitamin bliver sufficient. Denne kost synes imidlertid efter undersøgelser foretaget af Györgi, Kuhn og Jauregg (1933) ikke at indeholde B_{IV}-vitamin, saaledes at bestemmelserne foretaget hermed bliver B_{II} + B_{IV}-analyser.

Chick og Roscoe finder, at Kinnersley og Peters (1924) anti-neuritiske koncentrat fra gær er en god B₁-vitaminkilde uden maaelige B₁₂-vitaminmængder, men derimod indeholdende B₁₂. Flere andre forskere, bl. a. Evans og Burr (1928) anvender tikitiki, et alkoholisk risskalekstrakt, som kun indeholder lidt B₁₂-vitamin, og endelig har Guha og Drummond ved adsorption af alkoholiske ekstrakter af hvedekim paa trækul og fullerjord samt Williams, Waterman og Gurin ved lignende behandling af gærkstrakt opnaaet B₁-vitaminaktiverede præparater næsten befriede for B₁₂-vitamin. Endvidere har den internationale standard, Jansen og Donaths »acid clay preparation« været anvendt som B₁-kilde i nævnte øjemed, da det kun indeholder en ganske ringe mængde B₁₂-vitamin (Chick og Jackson 1932); derimod indeholder dette præparat en del B₁₂-faktor.

Ved gennemgang af de i literaturen foreliggende beskrivelser af metodiken ved B₁- og B₁₂-vitaminbestemmelser erfarer man, at man ved B₁-prøverne vel sørger for basalkostens indhold af B₁₂-vitamin og omvendt ved B₁₂-prøverne for dennes indhold af B₁-vitamin, medens der oftest tages meget lidt hensyn til, om faktorerne B₁₂ og Y ligeledes er til stede. Dette forhold volder ganske vist ogsaa betydelig vanskelighed, men man kan paa grund af, at disse faktoreres indflydelse paa væksten erfaringsmæssigt gør sig gældende senere end B₁- og B₁₂-vitaminerne, omgaa dette til en vis grad ved at sørge for at standse forsøget paa det tidspunkt, da en i begyndelsen hurtigt stigende vægtkurve begynder at aflades eller falde som følge af disse faktoreres mangel, og kun til sin bestemmelse anvende den jævne, stejle del af kurven, som udelukkende skyldes B₁- henholdsvis B₁₂-vitaminet i teststoffet.

Kendskabet til Readers B₁₂-faktor og navnlig til Y-faktoren er imidlertid meget ufuldstændigt, og forskellige undersøgelser fra den sidste tid tyder desuden paa, at vi endnu ikke er kommet til bunds i vort kendskab til B-vitaminkompleksets forskellige faktoreres antal. Saaledes har Chick og Jackson (1932) gennem nogle forsøg med standard acid clay i store doser givet sammen med autoklaveret gærkstrakt til rotter paa B-vitaminfri basal-kost vist, at en initial kraftig vægtstigning hurtig afløses af en affladning af kurven. Dette kan efter forff. mening ikke skyldes

B_I- eller B_{II}-vitaminsufficiens, da disse gaves i tilstrækkelige mængder, ej heller B_{IV}- eller Y-faktormangel, da disse fandtes henholdsvis i acid clay og i autoklaveret gær. Forff. antager derfor, at vægtfaldet skyldes en mangel paa en endnu ukendt faktor. (Da B_{II}-vitamin ved de nævnte undersøgelser gaves som et i 4 timer ved 120° C autoklaveret gærekstrakt i doser ækvi-valente med 0,5 gram tørgær, er den mulighed dog foreliggende, at gæren ved sin autoklaving havde mistet saa meget af sit B_{II}-vitaminindhold, at den anvendte dosis ikke længere var sufficient).

Der skal ikke her nærmere gøres rede for selve bestemmelsen af et teststofs B_I- eller B_{II}-potens, idet dette tidligere ved gennemgangen af de forskellige metoder er omtalt. Blot skal det atter pointeres, at medens man for B_I-vitaminets vedkommende kan udtrykke styrken i internationale enheder ved sammenligning med den internationale standard, maa man ved B_{II}-vitaminanalyser, hvor man endnu ikke har nogen saadan standard til disposition, som enhed fastsætte den mængde teststof, som formaar at bibringe dyrene en bestemt vægtforøgelse i en bestemt tid.

II. Kapitel.

INDLEDENDE FORSØG.

1. *Tidligere anvendt teknik ved B-vitaminundersøgelser samt drøftelse af grundkostens egnethed.*

I den tid, B-vitaminundersøgelser er foretaget paa universitetets hygiejniske institut, har man stedse draget nøje omsorg for, at de tidligere beskrevne almindelige krav, der er nødvendige for opnaaelsen af gode, konstante resultater, omhyggeligt er overholdt.

Som forsøgsdyr er anvendt albinorotter, opdrættede paa den af Gudjonsson angivne avlsdyrkost nr. 4; denne bestaar af 30 % skummetmælkpulver, 40 % risemel, 15 % gær og 15 % kokusnøddolie, hvori man blander en bestemt sufficient mængde standardiseret tran. Paa denne kost, hvis vitaminindhold (A- + D-vitaminer gennem tran, B-vitaminer gennem gær) er konstant, trives avlsdyrene godt og udviser god fertilitet. Ungerne, der skal anvendes til forsøg, tages fra moderen, naar de er 1 maaned gamle, hvorpaa de anbringes enkeltvis i vidmaskede, højbenede, galvaniserede jernbure. Dyrene faar først ledningsvand og B-vitaminfri grundkost ad libitum. Grundkosten bestaar af 20 % rensed kasein, 15 % rensed smørfedt, 60 % riststivelse og 5 % salte (Mc Collums saltblanding nr. 185). Kaseinet renses for B-vitamin ved kogning med fortyndet eddikesyre med paafølgende ekstraktion med 10 % svag eddikesur alkohol, hvorefter tørring og malning. Smørret befris for indhold af kasein, vand og salte ved smeltning og paafølgende aftapning af ovennævnte bestanddele i skilletragt. Dyrene vejes 1—2 gange ugentlig og deles, naar vægttab efter 2—3 uger er indtraadt, i grupper paa 3—4 dyr; hver gruppe faar nu som daglige eller ugentlige tillæg forskellige mængder af det stof, hvis B-vitaminindhold man

ønsker at bestemme. Den mængde teststof, som giver en gruppe rotter en gennemsnitlig ugentlig vægtforøgelse paa 7—8 g i en forsøgsperiode paa 5 uger, danner grundlag for beregning af den effektive rottedosis pr. g teststof. Metoden virker godt, men vil som tidligere omtalt angive mængden af den B-vitaminfaktor indenfor komplekset, der er sparsomst til stede i teststoffet.

En ulempe ved ovenfor nævnte kost er imidlertid smørret; dels er dette en forholdsvis kostbar fedtkilde, dels veksler smør i sammensætning. Det vil derfor være en fordel at erstatte smørfedt med et andet billigere fedtstof af konstant sammensætning; dertil har vi forsøgt at anvende jordnøddolie. Da denne imidlertid ikke indeholder A- og D-vitaminer, maa man sørge for en sufficient mængde af disse ved at give dyrene en bestemt mængde standardiseret levertran som tillæg. Smørbasalkosten synes imidlertid at have endnu en mangel, idet spredte fertilitetsforsøg med dyr paa denne kost med tillæg af gær i tilstrækkelig mængde til, at dyrene vokser normalt (de saakaldte positive kontroldyr paa normalkost), altid tidligere har givet negativt resultat (Clemmesen). Dette maa siges at være en væsentlig mangel ved en kost, der betegnes som normalkost. Det er derfor en nærliggende opgave efter erstatning af 15 % smørfedt med 15 % jordnøddolie + trantillæg i ovennævnte B-vitaminfri grundkost med tilføjelse af 5 % autolyseret, tørret overgær at undersøge, dels om denne forandring influerer paa vækstintensiteten, dels om rotternes fertilitet ændres herved.

Dette er foretaget gennem en række undersøgelser, som omtales udførligt andet steds, hvorfor disse her kun kort skal refereres. Med hensyn til detaljer henvises til dette arbejde.

Forsøget udføres med ialt 60 rotter, 30 hanner og 30 hunner. 15 hanrotter og 15 hunrotter faar i 10—11 uger smørnormal-kost, medens den anden halvdel af dyrene i samme tidsrum faar jordnøddolienormalkost med trantillæg, begge grupper faar dog først kostformerne som normalkost efter en 3 ugers B-vitaminfri forperiode. Tavle I viser væksten af han- og hundyr særskilt indenfor de 2 grupper; man ser, at der ingen væsentlig forskel findes paa de 2 kostformer med hensyn til de opnaaede vægtskurver; disse viser tillige et iøvrigt velkendt fænomen, nemlig en meget stor forskel paa hanrotters og hunrotters vækst, idet

hanrotterne vokser langt mere intenst end hunrotterne. Foretager man en opgørelse over, hvor stor forskel der er paa hanrotters og hunrotters gennemsnitlige vægtforøgelse efter henholdsvis 5 uger og 8 uger, viser det sig, at handyrerne gennemsnitlig tager 98 g paa i 5 uger og 134 g i 8 uger, medens de tilsvarende tal for hunrotternes vedkommende ligger ved henholdsvis 76,5 g og 98 g, altsaa en trods det ret korte tidsrum meget betydelig forskel.

I litteraturen findes en lang række opgørelser over rotters vækst paa forskellig kost; det vil her være af interesse at undersøge, hvordan vore rotters vækst ligger i forhold til andre laboratoriers forsøgsrotter. For at kunne drage direkte sammenligninger udregnes, hvor hurtigt en gruppe hanrotter gennemsnitlig vokser fra 60—200 g.

Donaldson (1915)	79 dage
Osborne og Mendel (1912)	94 »
do. (1919)	69 »
do. (1925)	68 »
do. (1926)	26 »
Gudjonsson (fødeblanding IV)	60 »
Anderson og Smith (1932)	23 »
Clemmesen (1930)	53 »
Egne dyr	59 »

Man ser heraf, at vore forsøgsdyr paa ovennævnte normal-kost vokser lige saa godt som vore avlsdyr paa Gudjonssons kost, hvilket maa siges at være overordentlig respektabelt og i denne henseende fuldt ud retfærdiggøre navnet normalkost. Clemmesens dyr, der faar smørnormalkost, vokser lidt stærkere end vore egne dyr; hvad dette skyldes, er umuligt at afgøre med sikkerhed; det drejer sig imidlertid kun om 7 dyr, og intet af disse har været udsat for en 3 ugers B-vitaminfri forperiode, saadan som tilfældet er med vore egne; dette forklarer maaske den nævnte forskel. Den stærke vægtforøgelse for Osborne og Mendels sidste dyr samt Anderson og Smiths dyr er opnaaet ved at give daglige store tillæg af gær, gær og salat eller lever.

Efter at vore dyr paa de 2 ovennævnte kostformer er blevet voksne, parres de indenfor hver gruppe. Derved fremkommer det interessante resultat, at alle dyrene, der faar jordnøddoliekost,

viser sig fertile, medens dette ikke er tilfældet med et eneste af dyrene paa smørnormalkost. Angaaende tydningen af de sig her-til knyttende problemer, maa atter henvises til ovennævnte arbejde.¹⁾

Denne ny normalkost, der altsaa kun adskiller sig fra den tidligere af institutet benyttede ved, at smørfedt er erstattet med jordnøddolie + tran, kan altsaa med fuld ret betegnes som normalkost, da den giver normal vækst samt fertilitet. Som grundkost uden gærtilblanding maa den paa forhaand anses for velegnet til vort formaal, da rotteunger, der faar denne kost, hurtigt tager af i vægt og dør, hvis tilførsel af B-vitamin undlades, idet nogle af dyrene forinden udvikler polyneuritiske symptomer, som tegn paa B_I-vitaminmangel. Da endvidere tidligere forsøg af Clemmesen viser, at omtrent halvdelen af en række rotter paa den gamle institutsmørkost, hvor vægtekurverne holdtes vandret gennem lang tid ved hjælp af smaa ugentlige tillæg af gær, udvikler dermatitis tydende paa B_{II}-vitaminmangel, maa man være berettiget til at slutte, at kosten er vel befriet for saavel B_I som B_{II}-vitamin.

2. Orienterende vækstforsøg med rotter paa varierende doser af forskellige gærsorter.

Endnu inden det stod os klart, hvilken fremgangsmaade vi vilde vælge til udførelsen af kvantitative B-vitaminmaalinger, har vi foretaget nogle orienterende forsøg over B-vitaminindholdet, maalt som samlet kompleks i forskellige slags gær, nemlig bryggeriovergær, bryggeriundergær og spritgær. Forsøgene er alle udført med 4 ugers rotteunger, der efter en ca. 3 ugers B-vitaminfri forperiode paa vor jordnøddoliegrundkost faar tillæg af testgæren 3 gange ugentlig. Gæren er presse-gær og uanset sorten behandlet paa nøjagtig samme maade, nemlig ved autolysering i termostat indtil gæren bliver flydende, udhældning i tyndt lag paa glasbakker, tørring med varm luft, hvorefter afskrælning og malning.

¹⁾ Histologiske forsøg med disse dyr foretaget af Ringsted tyder paa, at det har drejet sig om en E-vitaminmangel i smørret; forsøgene er udført med vintersmør, hvis indhold af E-vitamin er meget lavt. Senere forsøg af Ringsted viser, at sommersmør oftest tillader normal fertilitet.

Betragtes tavle nr. II, ses vægtkurverne for 8 hanrotter paa forskellige doser overgær. 15 cg om ugen af denne gær formaar at holde en rotte levende i ca. 9 uger, hvorefter den dør efter at have frembudt kraftige symptomer paa rotte-beri-beri (lammelser og kramper) samt lette dermatiske forandringer af poterne; dødsårsagen er her utvivlsomt en Br-vitaminmangel med deraf følgende patologiske manifestationer. 30 cg overgær om ugen giver omtrent vandret forløbende vægtkurve; efter 29 ugers forløb, da rotten tages ud af forsøget, findes denne mager med pjusket pels; den »gaar højt« (et fænomen, der senere skal omtales) med noget spastisk gang, men har ingen dermatitis, derimod priapisme. Alle de følgende dyr paa højere doser har ved forsøgets afslutning været naturlige. Vægtforøgelsen tiltager med stigende doser, saaledes at kurverne indført i et koordinat-system danner billedet af en »vifte«. Efter at være naaet op paa en gærdosis paa 18 g pr. uge, som er den højst forsøgte dosis, vokser dyret kraftigt, men formaar ikke længere at æde sin gærration op, idet der stadig levnes lidt af denne.

Sammenligner man denne vifte med en lignende over 8 hunrotter paa samme doser — tavle nr. III — ses spredningen her mindre udtalt, idet hunrotter vokser langt mindre intenst end hanrotter. For de 2 største dosers vedkommende ses betydelig stærkere vægttiltag end ved de mindre doser. 9 og 18 gram pr. uge formaar dyrene dog ikke at fortære.

Samme dosering af undergær for 8 hanrotters vedkommende giver en vifte meget lignende ovenfornævnte analoge, tavle nr. IV; dog synes der at være lidt mindre B-vitaminkompleks i undergær end i overgær, men man maa dog være meget varsom med slutninger, naar man kun har et dyr paa hver dosis. 18 g undergær pr. uge vil dyret ikke spise.

Ser vi endelig paa den analoge vifte for rotter med spritgærtillæg, tavle nr. V, opdager man en betydelig forskel ved sammenligning med vægtkurverne for bryggerigær, idet endog en dosis paa 1,5 g pr. uge ikke formaar at holde dyret i live, og vægtforøgelsen paa de lidt større doser her er langt mindre intens. Først doser paa 9—18 g pr. uge giver god, kraftig vækst, og disse doser fortærer dyrene uden at levne noget som helst,

hvilket viser, at en saadan gærmængde godt kan konsumeres, naar blot vitaminbehovet kræver det.

Ved alle 3 gærsorter ser man, at disse givet i smaa doser foraarsager, at dyrene ofte dør med polyneuritiske symptomer, hvorimod rottepellagra ikke fuldt udvikles i et eneste tilfælde. Dette taler for, at det er B_I-vitaminmangel, der gør sig mest gældende, og at det i virkeligheden er dette, der forekommer i mindst mængde i gæren, navnlig i spritgæren.

3. *Forsøg paa fremstilling af B_I- og B_{II}-vitaminekstrakter særskilt.*

For i et vilkaarligt teststof at være i stand til at bestemme B_I- og B_{II}-vitaminmængden hver for sig, maa man imidlertid, som vi tidligere har set, have disse vitaminer til disposition særskilt; her skal omtales vore forskellige forsøg i dette øjemed.

A. *Ekstraktionsforsøg a. m. Williams og Lewis samt Hunt og Wilder.*

I 1930 angiver Williams og Lewis og i 1931 Hunt og Wilder hver sin ekstraktionsmetode, hvorved disse forfattere mener at være i stand til at udtrække 2 faktorer af gær med forskellige opløsningsmidler og paaviser derefter, at der endnu i den behandlede gærrest findes en tredje faktor, der ligesom de 2 opløselige faktorer er nødvendig for at opnaa normal rottevækst.

For at forsøge at bekræfte disse forsøgsresultater og navnlig for om mulig gennem isolering af saadanne B-vitaminfraktioner at skaffe nødvendig basis for udførelsen af kvantitative undersøgelser af disse, eftergøres disse forsøg. Vor teknik, der saa vidt muligt er fuldstændigt i overensstemmelse med ovennævnte forfatteres angivelser med hensyn til ekstrakternes tilberedning, skal her gennemgaas, men paa grund af den ringe betydning, disse ekstrakter i det hele har faaet for vort arbejde og vor metodes gennemførelse, idet vi ikke har formaaet at opnaa de af forfatterne nævnte resultater, skal dette gøres saa kortfattet som muligt.

Gærekstraktion a. m. Williams og Lewis: 10 l 50 % alkohol bringes i kog paa vandbad; 2½ kg autolyseret, tørret bryg-

geriovergær koges heri $\frac{1}{2}$ time under omrøring, hvorpaa det henstilles under laag i 1 uge, idet man flere gange daglig foretager kraftig omrøring. Derpaa dekanteres ekstraktet, og resten presses gennem musselinpose. Bundfaldet behandles nu med varm 75 % alkohol, hvorefter atter henstilling i 4 dage under daglige omrøringer. Derefter atter dekantering og fornyet pressing. Denne procedure gentages med paavirkning af 90 % alkohol i 2 dage og 95 % i 1 dag. De samlede filtrater destilleres in vacuo ved ca. 15° C, medens det pressede bundfald tørres i 3 døgn ved stuetemperatur foran en elektrisk propel. Den tiloversblevne tørrede gærrest vejer nu 1300 g, d. v. s., at 1 g gær omtrent svarer til 0,5 g gærrest. Efter afdestillering af alkoholen tilsættes destilleret vand indtil 5000 cm³ ialt (dobbelt saa stort rumfang som forfatterne anvender, da ekstraktet er meget koncentreret), saaledes at 2 cm³ af dette ekstrakt svarer til 1 g originalgær. 1000 cm³ af dette fratages og anvendes som »helgærekstrakt«. Til resten sættes 1000 cm³ vand; da ekstraktet er uklart paa grund af kolloidal udfældning, frafiltreres disse kolloider paa büchnerfilter og opbevares til senere undersøgelse. (Det er ikke muligt at tørre disse, selv ikke ved 50 graders varme under centrifugalblæser, hvorfor de opslemmes i 1 l vand og doseres paa denne maade). Ekstraktets pH korrigeres nu med iseddike til 3,2, tilsættes 200 g fullerjord og rystes i rystemaskine i 4 timer, hvorefter man filtrerer gennem büchnerfilter og vasker med fortyndet eddikesyre af pH 3 paa filtret. Filtreringsvæsken og vaskevandet behandles med 200 g fullerjord, rystes og filtreres. Den samlede fullerjord tørres ved stuetemperatur foran propel. Ekstraktet inddampes først in vacuo ved 15—25° C, idet man tilsætter destilleret vand, inddamper, atter tilsætter vand og inddamper, ialt 5 gange; paa dette tidspunkt skummer væsken saa kraftigt, at man maa fortsætte paa en anden maade, nemlig i varmeskab ved 50° C under centrifugalblæsning. Slutresultatet bliver 2000 cm³ mørkebrunt ekstrakt med pH 6. 1 cm³ af dette svarer saaledes til 1 g gær, og 1 g aktiveret fullerjord svarer til 5 g gær.

Vor her angivne fremstillingsmaade varierer kun paa enkelte og uvæsentlige punkter fra Williams og Lewis' oprindelige teknik. Da ekstraktet efter afdestillering af alkoholen er meget

koncentreret, foretrækker vi at arbejde videre med halv saa stærk koncentration som den af forfatterne anvendte, idet vi dog naturligvis tager hensyn hertil i vore beregnede doser. Endvidere har vi før korrektionen af ekstraktets pH til 3,2 frafiltreret en del kolloider, som virkede som en meget stor og kraftig mængde stødpude, der vilde have foraarsaget, at den til korrektionen nødvendige iseddikemængde vilde være blevet meget stor, hvis disse kolloider ikke var blevet fjernede. De er senere særskilt prøvede ved rottevækstforsøg og synes ikke at indeholde B-vitamin. Disse ændringer kan vanskelig tænkes at have haft nogen som helst indflydelse paa den store divergens mellem forfatternes og vore egne vækstforsøg paa rotter, som nu skal gennemgaaes. Det skal kort bemærkes, at forfatterne fandt følgende: foruden B_I-vitaminet, som var knyttet til fullerjorden, og B_{II}-vitaminet, som fandtes i filtratet fra fullerjorden, vistest det, at man i gærresten havde endnu en gærfaktor, som var nødvendig for opnaaelsen af normal rottevækst, idet rotter, der fik B-vitaminfri basalkost med tillæg af baade B_I- og B_{II}-vitamin gennem ovenfornævnte præparationer eller gennem tillæg af helgærekstrakt, ikke formaaede at vokse normalt uden yderligere tilskud af lidt af gærresten, som saaledes syntes at indeholde endnu en rottevækstfaktor uopløselig i vand og alkohol.

Ser vi paa vore kurver paa tavle VI, er det straks paafaldende, at dyr paa basalkost med tillæg af fullerjord alene, af B_{II}-ekstrakt alene eller endog af gærrest alene tager noget paa i vægt, selv om de ved de anvendte doseringer ikke vokser normalt. Dette viser, at vi i alle 3 tillæg har i hvert fald noget af alle nødvendige B-vitaminfaktorer bevaret, da dyrene i modsat fald, hvis blot een manglede helt, vilde tabe i vægt. Det er altsaa ikke lykkedes for os at isolere nogen af disse faktorer. Endvidere viser vore kurver, at helgærekstraktet alene giver ligesaa god og normal rottevækst som dette givet sammen med gærresten, saaledes at vi ej heller har formaaet at faa holdepunkter for en tredie faktors tilstedeværelse i gærresten. Endelig synes kolloidopslemningen intet B-vitaminkompleks at indeholde. En del andre forsøgte kombinationer af tillæg gengives ikke, da ovenfornævnte maa antages tilstrækkeligt til at dokumentere, hvad der in casu er det essentielle.

Dernæst har vi anvendt Hunt og Wilders ekstraktionsteknik paa følgende maade: 1 kg autolyseret, tørret gær ekstraheres med 4 l 0,1 % eddikesyre i 24 timer, hvorefter den ovenstaaende væske afpipetteres. Bundfaldet ekstraheres med 2 l 0,1 % eddikesyre i 1 døgn, derefter atter afpipettering o. s. fr. ialt 14 gange. Bundfaldet (gærresten) tørres ved stuetemperatur foran en elektrisk propel, hvorved opnaas ialt 378 g. Filtratet koncentrerer til ca. 5 l ved henstilling i store, flade skaale foran elektrisk propel ved stuetemperatur. Under tilsætning af saltsyre, hvorved pH korrigeres til 4,5, fremkommer et bundfald, som bortkastes efter filtrering. Nu tilsættes fullerjord, 50 g pr. l med lejlighedsvis rystning i nogle timer. Filtrering sker paa büchnerfiltre, hvorefter fullerjorden skylles flere gange paa filtret med 0,1 % eddikesyre. Dette ekstrakt koncentrerer foran elektrisk propel ved stuetemperatur til 1000 cm³ (1 cm³ = 1 g oprindelig gær) og kaldes ligesom forfatterens analoge ekstrakt for B-ekstrakt (et i og for sig uheldigt valgt navn, idet dette nemt kan foraarsage, at man kan tro, at betegnelsen B har noget at gøre med hensyn til sit indhold af B-vitamin, hvilket ikke er meningen, idet det kun skal være til forskel fra nedenfor omtalte A-ekstrakt, der ej heller har noget med A-vitamin at gøre). Fullerjorden behandles derpaa paa filtret med 2,5 % bariumhydroksydopløsning, og filtratet neutraliseres hyppigt med 10 % svovlsyre; det fældede bariumsulfat frafiltreres, og filtratet koncentrerer foran en elektrisk propel ved stuetemperatur til 1000 cm³ (1 cm³ = 1 g oprindelig gær) og kaldes A-ekstrakt. Fullerjorden tørres ligeledes ved stuetemperatur, hvorved ialt opnaas 552 g af denne. Ved fremstillingen af disse ekstrakter er Hunt og Wilders teknik nøje fulgt.

Resultatet af fodringsforsøg paa rotter ses af tavle nr. VII. Det fremgaar tydeligt af de afbildede vægtkurver, at A-ekstrakt og B-ekstrakt givet hver for sig som tillæg til B-vitaminfri basalkost i noget større doser formaa at give nogen vægtforøgelse, hvilket vil sige, at disse ekstrakter ikke indeholder nogen B-vitaminfraktion helt isoleret. A-ekstrakt + B-ekstrakt giver udmærket vækst, og denne synes ikke at forbedres ved tillæg af fullerjordrest eller gærrest, hvilket taler mod disses indhold af en nødvendig rottevækstfaktor, ud over de allerede i A-

og B-ekstraktet værende faktorer, saaledes som forfatterne selv har fundet. Gærrest og fullerjordrest doseret alene formaar ikke at holde dyrene i live i de anvendte doser. At disse præparationer dog indeholder noget vækststimulerende, synes de kurver at tyde paa, hvor B-ekstraktet, der givet i mindre doser alene kun netop formaar at holde dyrene i live, ved samtidig tillæg af fullerjord- eller gærrest bibringer dyrene nogen vækst.

Vi er ikke gaaet meget i detaljer med hensyn til disse her netop nævnte metoder, da forsøgene i vore hænder, trods vor omhu for at afvige mindst muligt fra forfatternes egen teknik er faldet ud paa en saadan maade, at de til vort formaal — nemlig adskillelse af forskellige B-vitaminfraktioner — har vist sig uanvendelige.

B. *Forskellige B_{II}-vitaminikilder.*

Til B_I-vitaminanalysens udførelse har man som tidligere udførligt gennemgaaet brug for B_{II}-vitaminikilder, hvis indhold af B_I-vitamin bør være meget ringe — helst intet. Vi har i dette øjemed undersøgt en del forskellige præparationer, dels ekstrakter af gær autoklaveret forskellig tid for at odelægge B_I-vitaminindholdet i disse, dels honseæggehvide eller opløsninger af saadant; Chick og Roscoe o. a. har nemlig vist, at honseæggehvide indeholder B_{II}-vitamin, men intet B_I-vitamin (eller Y-faktor). Som gær har vi anvendt dels bryggeriovergær, dels spritgær; denne sidste maa paa grund af sit erfaringsmæssigt lave B_I-vitaminindhold og ret store B_{II}-vitaminindhold (Randoin og Lecoq; Scheunert og Schieblich; Quinn, Whalen og Hartley) anses for mest rationel i dette øjemed. Gæren vaskes med ledningsvand, og vaskevandet frafiltrereres ved sugning gennem büchnerfilter. Til 5 kg gær sættes nu 12½ l kogende vand, indeholdende 0,02 % eddikesyre; man opvarmer atter til kogning og filtrerer først gennem almindelige foldefiltre, dernæst gennem Seitzfilter. Ved pH 5—6 inddampes gennem kogning til et saadant rumfang, at 1 cm³ ekstrakt svarer til 2 g torgær. Tørstofbestemmelserne af presse-gær ligger hyppigst omkring 25 % tørstof, men disse bestemmelser maa naturligvis foretages for hver ny portion ekstrakt, man tilbereder. Gærekstraktet autoklaveres dernæst; vi har anvendt forskellig tid og forskelligt tryk; saa-

ledes er ekstrakt af bryggerigær autoklaveret 5 timer ved 1 atmosfæres overtryk eller 5 timer ved $1\frac{1}{2}$ atmosfæres overtryk; det samme gælder for spritgærekstraktets vedkommende, af hvilket dog desuden en prøve er autoklaveret 1 time ved 1 atmosfæres overtryk. Disse ekstrakter er anvendt til fodringsforsøg i doser paa $\frac{3}{4}$ cm³, $1\frac{1}{2}$ cm³, 3 cm³ og 6 cm³ 3 gange ugentlig. Den største dosis vægrer dyrene sig dog ved at spise helt op, naar den gives som eneste tilskud til basalkosten uden samtidig tilæg af B₁₂-vitamin.

Som æggehvidepræparationer er prøvet dels almindelig frisk, raa hønseæggehvide eller tilsvarende opløsning af et kinesisk tørret æggehvidepræparat (albuminum ovum siccum), dels disse præparater efter udfældning af proteinet, hvorefter B₁₂-vitaminet formentlig skulde være at finde i opløsningsmidlet.

Chick og Roscoe angiver, at 5 cm³ frisk hønseæggehvide er en sufficient B₁₂-vitamindosis for unge voksende rotter. Ud fra denne dosis som middeldosis er de senere udregninger foretaget. 5 cm³ æggehvide med 11,9 % tørstof = 0,6 g tørstof; tørret æggehvide har 86,6 % tørstof.

Af en 10 % opløsning af tørret æggehvide i vand vil ca. 7 cm³ ækvivalere med hensyn til tørstofindhold med 5 cm³ frisk æggehvide. Ved hjælp af kogning med Sørensen-væske (acetat-eddikesyreblending) er dels frisk æggehvideopløsning, dels opløsning af tørret æggehvide gjort æggehvidefri og dosering beregnet som følger: 727 g frisk æggehvide opløses i 1000 cm³ vand, hvorpaa tilsættes 100 cm³ Sørensen-væske. 727 g æggehvide indeholder $\frac{727 \times 11,9}{100} = 86,51$ g tørstof. Hvis 5 cm³ æggehvide = 0,6 g tørstof er passende dosis, findes altsaa i de 1100 cm³ $86,51 : 0,6 = 144$ doser, hvorfor 7,6 cm³ fældet frisk æggehvideopløsning er ækvivalent med 5 cm³ frisk æggehvide.

100 g tørret æggehvide opløses i 1000 cm³ vand, hvorpaa tilsættes 100 cm³ Sørensen-væske. 100 g tørret æggehvide indeholder 86,6 g tørstof; ialt findes altsaa i de 1100 cm³ $86,6 : 0,6 = 144$ doser, hvorfor 7,6 cm³ fældet 10 % tørret æggehvideopløsning er ækvivalent med 5 cm³ frisk æggehvide.

Der er af disse æggehvidepræparationer anvendt forskellige doseringer, alle omtrent svarende til et multiplum af den med 5

cm³ frisk æggehvite ækvivalente mængde. Ved de højere doseringer er væskerne koncentreret, da dyrene ellers ikke formaar at spise den tilbudte mængde.

C. *Forskellige Br-vitaminkilder.*

For at forsøge at fremstille Br-vitaminekstrakter fri for Br-vitamin er vi gaaet 2 veje, dels ved at udtrække Br-vitamin af Br-vitaminrige, men Br-vitaminfattige kilder, f. eks. majsmelet med opløsningsmidler, hvori Br-vitamin er letopløseligt, men Br-vitamin tungtopløseligt — alkohol af høj koncentration — a. m. Bourquin—Sherman, dels ved selektiv adsorption fra Br-vitaminholdige ekstrakter (gærekstrakter) med dertil egnede substanser (fullerjord) og sekundær eluering af dette med paafølgende koncentration — a. m. Kinnersley og Peters.

Teknik: 1) 1200 g majsmelet rystes med 2250 cm³ 90 % alkohol (vol. %) i 1½ time, hvorefter 2 gange filtrering gennem büchnerfilter. Majsmelet rystes derefter med 1500 cm³ 90 % alkohol i 1 time, hvorpaa atter 2 gange filtrering med afsluttende vaskning paa filtret med 450 cm³ 90 % alkohol. De samlede filtrater inddampes in vacuo ved 50° C paa vandbad til ca. 800 cm³. Til slut opsuges dette ekstrakt paa 450 g risstivelse, som atter tørres foran propel ved stuetemperatur. Den saaledes aktiverede stivelse anvendes forsøgsvis som Br-vitaminkilde, erstattende forskellig mængde stivelse i grundkosten (5—10—20—30—40—50—75 og 100 % af grundkostens stivelsesmængde).

2) Kinnersley og Peters tidligere nævnte antineuritiske koncentrat er et adsorptions-elueringsprodukt. Vi har ved fremstillingen af et saadant ekstrakt nøje anvendt den af forfatterne selv beskrevne teknik, blot har vi anvendt bryggerigær som udgangsmateriale og ikke som af Peters anbefalet bagerigær. Bagerigæren er nemlig her i landet — maaske i modsætning til bagerigæren i England — et Br-vitaminfattigt produkt, hvorfor man naturligvis ikke vil anvende denne ved fremstilling af Br-vitaminkoncentrater. Medens Peters og medarbejdere bearbejder 100—200 kg gær ad gangen, formaar vi med det os til raadighed staaende apparatur (gryder, kolber, centrifuge, filtre etc.) kun at bearbejde godt 6 kg ad gangen. Vore tal fremkommer som

tilsvarende brøkdele af de af Kinnersley og Peters opgivne mængder. 6360 g bryggeriovergær henstilles ved stuetemperatur i 2 døgn, hvorved gæren bliver delvis flydende; der tilsættes $2\frac{1}{2}$ l kogende vand, og blandingen opvarmes atter til kogning, hvorefter man centrifugerer. Bundfaldet (gæren) faar atter et opkog med $2\frac{1}{2}$ l friskt vand, hvorpaa fornyet centrifugering. Ekstraktet, som er mørkebrunt, henstaar natten over med ganske lidt (ca. 20 cm^3) 25 % neutral blyacetatopløsning. Næste dag tilsættes yderligere 25 % neutral blyacetatopløsning, indtil komplet fældning er indtraadt (ca. $600\text{--}800\text{ cm}^3$); paafølgende filtrering sker gennem almindelige foldefiltre. Til filtratet sættes 400 cm^3 bariumhydroksydopløsning mættet ved kogepunktet; derefter filtreres og tilsættes 25 % svovlsyre til filtratet, saaledes at reaktionen holdes sur overfor kongorødt som indikator; bariumsulfatet frafiltreres og pH korrigeres til 3,5 med 20 % natriumhydroksydopløsning overfor dimethylamidoazobenzol. Nu tilsættes 162 cm^3 Hopkins reagens, som er en 10 % opløsning af merkurisulfat i 7 % svovlsyre, hvorefter filtrering. Væsken, som paa dette tidspunkt ikke længere giver Hellers proteinreaktion, er langtfra fuldstændig fældet med reagenset. pH korrigeres til 7,0 ved hjælp af lakmus som indikator, og 82 g norrit (hollandsk trækulpræparat) tilblendes, hvorpaa man omrører $\frac{1}{4}$ time, filtrerer gennem büchnerfilter og skyller omhyggeligt med destilleret vand paa filtret. Trækullet opvarmes paa kogende vandbad med $\frac{1}{2}$ n. saltsyre, tilstrækkelig til at give sur reaktion paa kongorødt; dette behandles yderligere med ca. 700 cm^3 50 % alkohol, indeholdende 1 vol. % saltsyre, hvorefter man filtrerer gennem büchnerfilter. Ekstraktionsvæsken, hvis reaktion stadig skal være sur overfor kongorødt, skal passere filtret ialt 6 gange. Væsken inddampes paa vandbad in vacuo til ca. 120 cm^3 , tilsættes destilleret vand til dobbelt volumen, pH korrigeres til 4, og svovlbrinte gennemledes i 1—2 timer; bundfaldet frafiltreres, og væsken inddampes paa vandbad in vacuo til 60 cm^3 . Saa-vel dette som andre ekstrakter opbevares i frigidaire.

Til de første orienterende forsøg har vi anvendt dette ekstrakt i doser paa 2 eller 4 draaber 3 gange ugentlig.

Som B₁-vitaminkilde har vi endvidere anvendt Jansen og

Donaths acid clay preparation, den internationale standard, i doser paa 0,01, 0,02 og 0,04 g daglig, idet standardens B₁₂-vitaminindhold angives at være ganske ringe.

Endelig har vi forsøgt at kombinere majsmelekstraktionsmetoden med trækuladsorptionsmetoden. Det alkoholiske majsmelekstrakt fremstilles som tidligere beskrevet; det inddampes in vacuo til 200 cm³ og tilsættes destilleret vand til et rumfang paa 1000 cm³; den oprindelig klare, gule væske bliver nu mælket lignende æggemælk. De æteriske olier hindrer paa dette tidspunkt filtrering, hvorfor man skaffer sig af med disse ved tilsætning af 10 g bariumlte; væsken, der nu reagerer alkalisk (pH 8—9), gøres hurtigt neutral paa lakmus med saltsyre, hvorpaa 20 g norrit tilsættes; efter omrøring filtrerer man gennem büchnerfilter og skyller omhyggeligt med destilleret vand paa filtret. Trækullet behandles med 1/2 n. saltsyre og 200 cm³ 50 % saltsur alkohol som ovenfor beskrevet, hvorpaa filtrering og 6 gange ekstrahering efterfulgt af inddampning af ekstraktet in vacuo til 50 cm³.

For at udregne en passende dosering gaar man foreløbig ud fra, at en mængde paa 40 % aktiveret stivelse i kosten repræsenterer en passende B₁₂-vitaminmængde. I 1000 g kost er 60 % = 600 g stivelse, heraf er 40 % = 240 g aktiveret stivelse. En rotte fortærer daglig ca. 8 g kost, heraf altsaa $\frac{240 \times 8}{1000} = 1,92$ g aktiveret stivelse pr. die. 50 cm³ trækuladsorberet majsmelekstrakt svarer til 450 g aktiveret stivelse; heri findes 450 : 1,92 = 234 doser, altsaa $\frac{50}{234} =$ ca. 0,2 cm³ pr. dosis. Da 1 cm³ er fundet = 20 draaber, vil 0,2 cm³ være ca. 4 draaber. Ekstraktet er doseret med 8 og 16 draaber 3 gange ugentlig.

Med hensyn til de i dette arbejde foretagne tørstofbestemmelser er man gaaet frem efter den følgende teknik, som er almindelig anerkendt ved bestemmelse af tørstofindhold i foderstoffer, idet man foretager udtørring af stoffet, indtil 2 timers tørring ved 100° C ikke giver over 2—3 mg vægttab pr. 5 g stof. Ved tørstofbestemmelser af tykflydende, sejge væsker foretages tørringen af disse ved opslugning paa et tyndt lag pimpsten, som først er tørret i vejeglasset.

4. *Forsøg med forskellige B_I- og B_{II}-vitaminkilder og diskussion angaaende disses anvendelighed.*

De ovennævnte forskellige ekstrakter prøves nu gennem vækstforsøg paa rotter baade enkeltvis og kombineret som tillæg til vor B-vitaminfri jordnøddoliebasalkost i de efter deres fremstillingsmaade udregnede doser. Hvis denne basalkost anses for at være fuldstændig fri for saavel B_I- som B_{II}-vitamin, kan man ved betragtning af tavle VIII—XII slutte følgende: bryggeriovergærekstrakt autoklaveret i 5 timer ved 1 atmosfære, spritgærekstrakt autoklaveret 1 time ved 1 atmosfære samt omend i mindre grad bryggeriovergær autoklaveret 5 timer ved 1½ atmosfære indeholder saavel B_I- som B_{II}-vitamin, ligesom 40, 50 og 100 % aktiveret stivelse; Peters antineuritiske koncentrat og i mindre udtalt grad den internationale standard tilfører ligeledes dyrene saavel B_I- som B_{II}-vitamin, da der indtræder vægtforøgelse ved tillæg til basalkosten af disse præparationer; derfor maa de anses for uanvendelige til vort formaal.

Tilbage som eventuelt brugelige B_{II}-vitaminpræparater bliver altsaa spritgærekstrakt autoklaveret 5 timer ved 1 eller 1½ atmosfæres overtryk samt alle æggehvidepræparationerne og maaske omend mindre velegnet overgærekstrakt autoklaveret 5 timer ved 1½ atmosfære. Som B_I vitaminkilde bør 5—10—20 og 30 % aktiveret stivelse, trækuladsorberet majsmelekstrakt samt som mindre velegnet den internationale standard nærmere undersøges. For at prøve disse præparationers effektivitet gives de kombineret. Resultatet aflæses af tavlerne XIII—XVII. Man ser f. eks. af tavlerne XV—XVI, at den internationale B_I-vitamin-standard sammen med proteinpræparater giver moderat, men omtrent ens vækst, hvad enten man anvender store eller smaa doser af disse sidste. Da denne kombination giver stærkere vægtforøgelse end standard administreret alene, maa man antage, at proteinpræparationerne indeholder noget B_{II}-vitamin. Tavle XV viser endvidere, da proteinpræparationerne givet sammen med en kost indeholdende 20 % aktiveret stivelse ikke forårsager vækst, at der ikke kan findes større B_I-vitaminmængde i dette sidste. En del andre kombinationer er forsøgt og giver, som kurverne viser, enten ingen vækst som f. eks. trækuladsorberet majsmelekstrakt sammen med spritgærekstrakt — tavle

XVII — eller stærk vækst, som man maatte vente, ved at give Peters B₁₂-vitaminekstrakt sammen med autoklaveret gær — tavle XVII — eller 30—50 og 100 % aktiveret stivelse sammen med autoklaveret overgær — tavle XIII.

Resultatet af disse præliminære forsøg var, som man forstaar, betydeligt nedslaaende. Navnlig maatte man forundres over, at et ekstrakt som Peters antineuritiske koncentrat, der ifølge Peters egne angivelser ikke giver vækst mere end højst 1—2 uger, naar det gives som tillæg til B-vitaminfri basalkost, her ved disse forsøg giver ganske god vækst trods vor fremstillingsmaades overensstemmelse med Peters egen. For imidlertid med sikkerhed at faa konstateret, om vor fremstillingsteknik alligevel havde svigtet, prøvede vi et originalt ekstrakt, som venligst var overladt os af Peters selv. Resultatet af disse undersøgelser findes opført paa tavle XVII og svarer ganske til de med det af os selv fremstillede ekstrakt opnaaede resultater. Konsekvensen af dette maa nødvendigvis blive, at enten opfylder Peters ekstrakt ikke de ønskede betingelser, eller ogsaa er vor basalkost ikke som paa forhaand antaget tilstrækkelig befriet for (i hvert fald) B₁₂-vitamin.

5. *Forskellige kaseinrensningprocesser.*

Vi har tidligere gennemgaaet vore forskellige holdepunkter for, at den af os valgte og gennemprøvede basalkost virkelig maatte formodes at tilfredsstille de af os forlangte krav. Ovennævnte forsøg nødvendiggør imidlertid, at vi endnu engang gennemgaar kostens forskellige bestanddele med hensyn til disses mulige indhold af B-vitamin og navnlig B₁₂-vitamin, og vi standser da ved kaseinet som den eneste sandsynlige B₁₂-vitaminkilde i grundkosten. Selv om vi, som tidligere beskrevet, omhyggelig renser vor kasein, er der alligevel en betydelig forskel mellem den af os anvendte rensningsmetode og de metoder, der foretrækkes flere andre steder, navnlig i England og Amerika. Disse rensningsprocedurer har vi derfor forsøgt; med hensyn til tekningen henvises til vor tidligere omtale heraf.

Den engelske kaseinrensningssmetode kræver som en afsluttende behandling en 3 døgns ristning ved 120° C. Dette er en meget vanskelig procedure og lykkes ikke for os ved anvendelse

af en større ovn med flere hylder, idet temperaturen ved nøjere undersøgelser veksler meget betydeligt de forskellige steder i ovnen. Derimod lykkes det at indstille en mindre, elektrisk ovn saaledes, at den — ofte kontrollerede — temperatur holder sig ved 120° C ved kaseinets overflade. Kaseinet spredes ud i et tyndt lag og vendes flere gange daglig, saaledes at man kan være sikker paa, at kaseinet virkelig har været udsat for netop 120° C.

Af saaledes ristet kasein tilberedes en normalkost af saavel kasein rensat paa vor sædvanlige maade som rensat efter den engelske metode. Resultatet ved fodringsforsøg ser man af tavle XVIII. Dyrene tager meget sparsomt paa i vægt, saaledes at kosten langt fra kan betragtes som normalkost. Dette maa skyldes ristningen, som tildels har ødelagt kaseinet. Man maa altsaa antage, at den af Chick og Roscoe angivne teknik ikke kan være nøje overholdt i disse forfatteres egne forsøg; rimeligvis har kaseinet ikke været udsat for den angivne temperatur, som maa være maalt et andet sted i ovnen end der, hvor kaseinet har befundet sig. Anvender man derimod kaseinet rensat efter den engelske metode, men uden efterfølgende ristning, ser man de paa tavle XIX angivne forhold. De negative kontroller inkl. rotter, der faar enten B_I- eller B_{II}-vitamin, dør hurtigt, medens dyrene, der faar normalkost, vokser fortrinligt.

Den amerikanske kaseinrensningss metode har vi ligeledes anvendt, og resultaterne, som falder ganske ud paa samme maade som for den engelske kaseinrensningssproces' vedkommende (dog uden ristningsproceduren), ses af tavle XX. Det er herigennem vist, at vor tidligere anvendte kost lider af den betydelige mangel ikke at være ordentlig rensat for B-vitamin, og at dette har været knyttet til kaseinet og ikke til stivelsen, fedtet eller saltene.

6. *Fornytt prøvning af vore forskellige B_I- og B_{II}-vitamin-kilder.*

Forsøg med tillæg af B_I- og B_{II}-vitaminpræparationer til B-vitaminfri basalkost, hvori kaseinet er rensat enten efter engelsk eller amerikansk metode, falder ganske ensartet ud; resultaterne ses af tavle XIX—XX. Gives autoklaveret spritgærekstrakt som

tillæg, dør dyrene hurtigt, dog ikke sjældent først efter en kortvarig vægtstigning, der afløses af et brat vægtfald. Noget længere levetid, dog uden nævneværdig vægtforøgelse, opnaar de dyr, der kun faar Peters B_I-vitaminekstrakt som tillæg. Derimod indtræder god og kraftig vægtforøgelse, naar man baade giver tillæg af Peters B_{II}-ekstrakt og autoklaveret spritgærekstrakt.

For afgørende at fastslaa, at rotter virkelig til opnaaelse af god vækst kræver 2 forskellige faktorer, maa man kræve, at en ringe mængde af en præparation givet sammen med en ringe mængde af en anden tillader god vægtforøgelse, medens store doser af hver enkelt af disse givet alene ikke foraarsager vægtforøgelse. At dette er tilfældet med de her nævnte ekstrakter, ses f. eks. af tavle XX, hvor der er givet doser af Peters ekstrakt alene helt op til 8 draaber 3 gange ugentlig uden vægtforøgelse samt autoklaveret spritgærekstrakt alene i doser paa 4 cm³ 3 gange ugentlig (mere gærekstrakt vil smaa rotteunger ikke spise) ligeledes uden vægtforøgelse; giver man derimod 2 draaber Peters ekstrakt sammen med 2 cm³ autoklaveret gærekstrakt 3 gange ugentlig, ser man, at dyrene tager ligesaa godt paa i vægt som dyr paa normalcost.

Særlig tydeligt er dette forhold vist ved anvendelse af dyr, der i en 10 ugers vækstperiode har opnaaet en god vægt ved tillæg af stor B_I- og B_{II}-vitaminmængde til B-vitaminfri kost. Paa dette tidspunkt seponeres enten B_I- eller B_{II}-ekstraktet; i det første tilfælde faar dyrene fremdeles B_{II}-ekstrakt, der nu gives ad libitum, og det viser sig, at dyrene prompte tager af i vægt; dette vægtfald er meget hurtigt, ofte 20—30 g eller mere pr. uge, og døden indtræder efter 2½—8 ugers forløb, afhængigt af dyrets størrelse paa tidspunktet for B_I-ekstraktets seponering. Oftest optræder typiske polyneuritiske rotteberi-berikramper de sidste dage før dødens indtræden (iagttaget hos 9 af 12 dyr). Endvidere observeres det forhold hos nogle dyr, der i vækstperioden (10 uger) har faaet meget store B_I-vitaminmængder tildelt, nemlig 10 draaber Peters B_I-ekstrakt daglig, at disse efter B_I-doseringens ophør endnu 2 uger vedbliver at tage paa i vægt, omend mindre kraftigt end tidligere, tydende paa, at disse dyr har ophobet B_I-vitamindepoter under rigelig administration af dette vitamin. Efter 2 uger er depotet udtømt, og vægttabet

indtræder; se tavle XXI. Dyr nr. 984 derimod, der kun faar Br-vitamin i stor mængde i 2 uger (samme dosering som ovenfor nævnt), har i denne kortere periode intet depot aflejret.

I begyndelsen kort efter Br-ekstraktets seponering spiser dyrene ofte $4\frac{1}{2}$ —6 cm³ eller mere BII-ekstrakt daglig, men tager alligevel af i vægt, hvilket viser BII-ekstraktets absolute mangel paa Br-vitamin; senere, naar appetiten er sunket stærkt, forærer dyrene en periode ca. 3 cm³ BII-ekstrakt om dagen, og først kort før døden indtræder, synker den daglige frivilligt indtagne mængde til ca. 1—2 cm³.

I de tilfælde, hvor BII-ekstraktet seponeres og Br-ekstraktet fortsat doseres i stor mængde (Peters Br-ekstrakt 10 draaber daglig), indtræder ligeledes et vægttab, men dette sker væsentlig langsommere end i ovennævnte eksempler, strækkende sig over 15—18 uger; paa dette tidspunkt indtræder døden, uden at man hos noget af disse dyr observerer symptomer paa rottepellagra (dermatitis), se tavle XXII. Nr. 985, der i 2 uger faar BII-ekstrakt tilført ad libitum og af dette i denne periode daglig forærer 4—7 cm³, har ikke i denne tid aflejret noget BII-vitamin-depot.

Det vil antagelig her være af interesse at undersøge, hvordan det gaar med appetiten hos disse større dyr paa henholdsvis Br- og BII-vitaminmangel. Den daglig indtagne kostmængde er maalt for henholdsvis nr. 984, 988, 989 og for nr. 985, 986, 987. Medens begge grupper i de sidste 3 uger førend dyrene berøves enten Br- eller BII-vitamin har spist gennemsnitlig 64 g basalkost pr. uge, falder den indtagne kostmængde for den første gruppes vedkommende til henholdsvis 40, 13, 18, 23 og 24 g gennemsnitlig pr. dyr pr. uge, efter vægttabets begyndelse indtil døden indtræder, medens den anden gruppes tilsvarende tal viser sig at være 62, 51, 47, 45, 41, 36, 39, 33, 35, 34, 30, 33, 34, 31.

Man ser heraf for den første gruppes vedkommende (Br-mangeldyrene), at det største saavel absolute som relative appetittab sker i anden uge efter Br-vitamininddragelsen; derefter kommer der atter en let forøget appetit de følgende uger, indtil dyrene dør; derimod indtræder det stærke vægttab straks allerede i første uge, hvor dyrene endnu spiser nogenlunde, og fort-

sættes stadig hurtigt, uden at den let forbedrede appetit de sidste uger førend døden lader sig spore paa de stærkt faldende vægtekurver.

For den anden gruppes vedkommende (B_{II}-mangeldyrene) ser man, at den indtagne kostmængde falder ganske jævnt i løbet af 5—6 uger til et niveau, hvorefter dette bevares ret konstant, medens vægten af dyrene stadig falder ganske jævnt.

Hvilken faktor vort kasein i vor oprindelige grundkost endnu trods rensningsforsøg indeholder, fremgaar af tavle VIII; man ser her, at der indtræder god vækst ved tillæg af Peters ekstrakt til vor oprindelige B-vitaminfri basalkost, medens dette ikke sker, naar man giver dette ekstrakt som supplement til vor ny kaseinrensede kost. Det er saaledes tydeligt, at kaseinet renses efter vor oprindelige metode i hvert fald har indeholdt noget B_{II}-vitamin og netop saa meget, at sufficient B_I-vitamintillæg kan give vækst. Derimod synes vor gamle kost ikke at indeholde B_I-vitamin, da tillæg af autoklaveret spritgærekstrakt til denne saavel som til den ny kost, som vist henholdsvis paa tavle IX og XVIII—XIX, ikke giver vækst.

Efter de oplysninger, vi nu har opnaaet angaaende vor oprindelige »B-vitaminfri« kost, nemlig at den indeholder noget B_{II}-vitamin, men intet B_I-vitamin, vil det være af interesse at se, hvad vi kan slutte af vore tidligere forsøg med denne med henblik paa de forskellige præparationers indhold af B_I- og B_{II}-vitamin.

Ser vi først paa de anvendte formodede B_{II}-vitaminkilder (tavle VIII—X), fremgaar det tydeligt, at bryggerigærekstrakterne autoklaverede 5 timer ved 1 og 1½ atmosfæres overtryk samt spritgærekstrakt autoklaveret 1 time ved 1 atmosfære indeholder noget B_I-vitamin, da de som tillæg til en absolut B_I-vitaminfri kost kan bringe dyrene til at vokse. Derimod indeholder spritgærekstrakter autoklaverede 5 timer ved 1 og 1½ atmosfæres overtryk samt de forskellige æggehvidepræparationer intet B_I-vitamin. At spritgærekstrakt autoklaveret 5 timer ved 1½ atmosfære er en god B_{II}-vitaminkilde, har vi netop set af det foregaaende. Spritgærekstrakt autoklaveret 5 timer ved 1 atmosfære maa altsaa ligeledes være anvendelig. Æggehvidepræparationerne maa i hvert fald indeholde en del B_{II}-vitamin.

da de alle, som tidligere vist, formaar at bringe rotter, der faar standard acid clay som B_I-vitaminkilde, til at vokse betydelig bedre, end hvis dyrene blot faar standarden alene som tillæg.

Angaaende de af vore forskellige B_I-vitaminkilder (tavle XI—XII), som har fremkaldt vægtforøgelse, er det vanskeligt at udtale sig med bestemthed, da vi jo nu véd, at grundkosten har indeholdt lidt B_{II}-vitamin. Men man kan dog med sikkerhed sige, at de præparationer, der som tillæg til kosten absolut ingen vægtforøgelse har frembragt, ikke er B_I-vitaminholdige og saaledes heller ikke anvendelige til vort formaal. Dette er tilfældet med kost, hvoraf den tilbandede stivelse 5, 10, 20 og 30 % er aktiveret og ligeledes med trækuladsorberet majsmeleks-trakt i de anvendte doser. Med hensyn til anvendelse af aktiveret stivelse i større mængde end 30 % som B_I-vitaminkilde samt proteinpræparationers indhold af B_{II}-vitamin henvises til senere afsnit.

Ser vi endelig paa vore vægtkurver, opnaaet ved tillæg af 1) Williams og Lewis eller 2) Hunt og Wilders forskellige gærfraktioner, kommer vi til følgende resultat. ad 1): gærresten kan i hvert fald ikke være rensed for B_I-vitamin, da tillæg af denne giver moderat vægtforøgelse; det samme er tilfældet med det saakaldte »B_{II}-ekstrakt«; om fullerjorden derimod har været ganske befriet for B_{II}-vitamin kan ikke med sikkerhed afgøres. ad 2): Baade A- og B-ekstraktet har indeholdt B_I-vitamin, derimod kan man ikke med sikkerhed afgøre, hvilket af disse har indeholdt B_{II}-vitamin. At gærresten og fullerjordresten er rensede for B_I-vitamin synes forsøgene at godtgøre; hvorvidt de samtidig er helt befriede for B_{II}-vitamin kan ikke bestemmes.

Med hensyn til den tidligere konklusion angaaende vore forskellige »gærvifter« med over-, under- og spritgær er der nu ikke væsentligt at ændre.

7. *Forsøg, der viser vor ny kosts sufficiens i forskellig henseende.*

For at se, om vore rotter, der i nogle maaneder har faaet lov at vokse paa vor ny basalkost med stærkt rensed kasein samt tillæg af sufficient B_I-vitaminmængde givet som Peters B_I-eks-

trakt og B_{II}-vitaminmængde givet som autoklaveret spritgær-ekstrakt, kan siges at være normale, undersøger vi i lighed med tidligere nævnte forsøg vækstintensiteten hos saadanne dyr. Det drejer sig om et par hanrotter, der er vokset fra 33 g til henholdsvis 178 og 188 g i løbet af 9 uger, samt 2 hunrotter, der er vokset fra 31 g til henholdsvis 130 og 150 g i samme tidsrum. Hanterne har altsaa gennemsnitlig taget 17 g paa pr. uge, hunterne 12 g paa pr. uge, hvilket omtrent svarer til gennemsnittet af vore tidligere omtalte dyr paa den oprindelige smør- og olienormalkost, hvor hanrotterne gennemsnitlig i 9 uger tog 16 g og hunterne 11 g paa i vægt pr. uge.

At dyr paa saa stærkt rensed kost, som det her er tilfældet, vokser lige saa intest som vore avlsdyr paa avlsdyrkost, er i sig selv bemærkelsesværdigt. Men yderligere interessant er det at konstatere, at disse dyrepar — bragt sammen parvis — straks efter 3 ugers forløb formaar at avle unger; man kan altsaa med rette slutte, at disse rotter, saavel med hensyn til vægtforøgelse og vækstevne som med hensyn til fertilitet maa betegnes som normale. Til slut skal tilføjes, at vor basalkosts kalorieindhold er 505½ kal. pr. g tørstof og indholder 2,99 % kvælstofindhold ligeledes pr. g tørstof. Tørstofindholdet er maalt til 92,4 %.

8. *Bestemmelse af sufficient mængde B_I-vitamin som Peters B_I-ekstrakt og B_{II}-vitamin som autoklaveret spritgær-ekstrakt.*

I det følgende kapitel skal vises, hvordan man kan benytte Peters B_I-ekstrakt og autoklaveret spritgær-ekstrakt som henholdsvis B_I- og B_{II}-vitaminkilde ved B_{II}- og B_I-vitaminanalyser. For imidlertid at være i stand til at udføre dette, maa man, som allerede berørt i indledningen, først bestemme den dosis af hvert af disse ekstrakter, som er den suffiente til opnaaelse af optimal rottevækst. Dette afgøres ved betragtning af tabel 1, hvor man dels har holdt B_I-vitaminmængden konstant og varieret B_{II}-vitaminmængden og dels har holdt B_{II}-vitaminindosis konstant og varieret B_I-vitaminindosis.

TABEL 1.

Nr.	0	1	2	3	4	5	6	7	8 uger	
894	41	60	88	111	131	143	153	166	173	Peters Brekstrakt 1 draabe daglig. Brekstrakt 1 cm ³ daglig.
896	27	52	77	95	113	130	142	154	159	
898	36	65	90	114	139	160	172	177	179	
949	40	67	91	109	130	148	168	187	203	
966	34	58	82	100	119	136	149	157	167	
		24,8	25,0	23,4	22,7	21,6	20,2	18,9	17,6	gennemsnitlig vægtforøgelse pr. dyr pr. uge.
597	25	55	79	100	119	137	145	145	153	Peters Brekstrakt 1 draabe daglig. Brekstrakt 2 cm ³ daglig.
602	18	35	59	78	102	131	151	162	170	
603	23	40	65	86	108	130	147	159	169	
605	21	40	66	92	114	138	148	154	160	
630	34	65	88	115	134	140	149	159	164	
		22,8	23,6	23,3	22,8	22,2	20,6	18,8	17,5	gennemsnitlig vægtforøgelse pr. dyr pr. uge.
902	27	48	71	93	113	134	148	160	168	Peters Brekstrakt 1 draabe daglig. Brekstrakt ad libit. (4—5 cm ³ daglig).
903	29	50	75	98	124	146	158	167	173	
904	31	51	71	94	121	144	156	169	185	
		20,7	21,7	22,0	22,6	22,5	20,8	19,5	18,3	
909	30	55	73	93	115	138	155	168	184	Peters Brekstrakt 10 draaber daglig. Brekstrakt 1 cm ³ daglig.
920	29	52	73	95	114	143	165	182	198	
939	32	49	71	95	121	152	172	190	208	
		21,7	21,0	21,3	21,6	22,8	22,3	21,4	20,8	

Man ser, at den ugentlige vægtforøgelse pr. dyr i alle grupper er omtrent ens, svarende godt til hinanden i størrelsesorden. Det vil sige, at hvis man vælger 1 cm³ B₁₂-ekstrakt som daglig B₁₂-vitamindosis eller 1 draabe Peters ekstrakt som daglig B₁-vitamindosis, er man paa den sikre side, idet selv mangedobling af disse doser ikke formaar at sætte væksten i vejret indenfor forsøgsperioden.

III. Kapitel.

UDARBEJDELSE AF GRUNDLAGET FOR UDFØRELSEN AF METODEN TIL KVANTITATIV B_I- OG B_{II}- VITAMINBESTEMMELSE.

1. *Gennemgang af standardkurver.*

I det foregaaende kapitel har vi vist, at det er lykkedes for os for det første at faa sammensat en grundkost, som er saa godt rensat for saavel B_I- som B_{II}-vitamin, at den er anvendelig til vort formaal, for det andet at fremstille B_I-vitaminfrit B_{II}-vitaminekstrakt og B_{II}-vitaminfrit B_I-vitaminekstrakt, samt for det tredje at bestemme disse ekstrakters sufficente dosis. Endelig har vi, som det fremgaar af sidste kapitel, for det fjerde gennem kurative forsøg sikret os, at B_I-ekstraktet virker helbredende overfor rotters B_I-avitaminose (rotteberi-beri), ligesom B_{II}-ekstraktet overfor rotters B_{II}-avitaminose (rottepellagra). Vi har set, at hvis B_I- eller B_{II}-ekstraktet gives alene selv i store doser som tillæg til vor grundkost, vokser rotterne ikke, men gives blot en forholdsvis ringe mængde af hvert af disse ekstrakter, tager dyrene godt paa i vægt. Vi véd desuden, at hos en rotte, der faar B-vitaminfri grundkost med sufficient mængde B_{II}-vitamin som tillæg og som bringes til at vokse ved yderligere dosering af et teststof, vil dyrets vægtforøgelse afhænge af B_I-vitaminmængden i dette teststof. Ganske det analoge forhold er tilfældet for B_{II}-vitaminets vedkommende.

Dette skal i det følgende gøres til genstand for en nærmere undersøgelse. Til disse forsøg anvendes udelukkende 3 ugers hanrotteunger, der alle fra dette tidspunkt faar B-vitaminfri grundkost samt vand og A- + D-vitamin som tidligere beskrevet, indtil vægten aftager. Saasnart dette er konstateret, gives den tid-

ligere beregnede sufficente mængde B₁₂-vitamin, nemlig 1 cm³ daglig af vort B₁₂-vitaminekstrakt (5 timer ved 1½ atmosfære autoklaveret spritgærekstrakt) eller den ligeledes beregnede sufficente mængde B₁-vitamin, nemlig 1 draabe af Peters B₁-vitaminekstrakt daglig. Saa snart vægttab paa ny er indtraadt, gives i første tilfælde forskellige mængder af den internationale standard for B₁-vitamin, i det andet tilfælde forskellige mængder af vort B₁₂-ekstrakt. For hver dosering anvendes 5 dyr. Indtil de 2 ovenfor nævnte vægttab er konstateret, er det nødvendigt daglig at veje dyrene, for, saa snart vægttab er indtraadt, at foretage ovennævnte dosering; i modsat fald vil man uvægerligt miste mange af sine dyr, idet disse dør, inden man naar at paabegynde den egentlige forsøgsperiode.

Under forsøgsperioden, som vi her overalt har ladet være 10 uger, vejes dyrene ugentlig, altid samme dag og paa samme tidspunkt af dagen.

Ialt har vi anvendt 21 forskellige doseringer, fordelende sig paa grupper med 5 dyr som rent negative kontroller, 10 dyr som delvis negative kontroller, idet 5 af disse kun faar B₁-vitamin og 5 kun B₁₂-vitamin. 10 forskellige doseringer af B₁-vitamin givet daglig som følgende multipla af den internationale enhed (0,01 g standard acid clay) 4 — 3 — 2 — 1,5 — 1 — 0,75 — 0,50 — 0,20 — 0,10 og 0,02, hvilket vil sige 0,04 — 0,03 — 0,02 — 0,015 — 0,01 — 0,0075 — 0,005 — 0,0002 — 0,001 og 0,0002 g B₁-standard er anvendt til grupper af dyr, der faar sufficent B₁₂-vitaminmængde, og endelig er vort B₁₂-vitaminekstrakt doseret i følgende mængder: 2 — 1 — 0,5 — 0,2 — 0,1 — 0,05 — 0,01 og 0,005 cm³ til grupper af dyr, der i forvejen faar Peters B₁-vitaminkoncentrat i sufficent mængde.

De derved fremkomne vægtkurver ses enkeltvis paa tavlerne XXIII—XLIII, medens tavlerne XLIV—XLV viser de gennemsnitlige vægtkurver for hver dosering — altsaa gennemsnitsvægtforøgelsen for 5 dyr. De til hele uger interpolerede vægtmaalinger samt heraf udregnede vægtforøgelser er opført i følgende tabeller.

TABEL 2.

Nr.	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	uger	
566	41	62	87	104	128	157	175	183	191	187	194	International Br-standard 0,04 g daglig. Br-ekstrakt 1 cm ³ daglig.	
569	39	59	84	102	122	152	170	183	193	195	205		
570	40	62	91	110	132	162	175	193	203	213	225		
572	37	57	77	92	114	138	155	169	179	187	197		
573	35	52	74	91	113	143	164	175	184	186	196		
gnstl. vægtforøgelse pr. dyr.													
		20,0	44,2	61,4	83,4	112,0	129,4	142,2	151,6	155,2	165,0		
984	38	56	72	90	110	130	145	157	166	175	184	International Br-standard 0,03 g daglig. Br-ekstrakt 1 cm ³ daglig.	
985	34	50	64	77	94	118	135	147	157	164	170		
986	30	49	70	87	113	137	150	161	169	180	187		
987	32	53	74	87	108	137	155	169	184	188	198		
988	38	56	75	94	116	138	156	170	182	190	195		
gnstl. vægtforøgelse pr. dyr.													
		18,4	36,6	52,6	73,8	97,6	113,8	126,4	137,2	145,0	152,4		
872	25	46	65	83	104	121	128	133	141	152	159	International Br-standard 0,02 g daglig. Br-ekstrakt 1 cm ³ daglig.	
873	34	53	72	90	105	120	132	142	157	167	172		
874	35	58	78	90	102	109	110	110	118	124	128		
887	26	35	51	68	79	93	107	120	129	138	146		
940	51	70	92	111	124	138	152	159	158	158	159		
gnstl. vægtforøgelse pr. dyr.													
		18,2	37,4	54,0	68,6	82,0	91,6	98,6	106,4	113,6	118,6		

TABEL 2 (forts.)

Nr.	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	uger	
876	37	58	73	90	101	106	110	118	118	124	130		International Br-standard 0,015 g daglig. Br-ekstrakt 1 cm ³ daglig.
877	37	55	71	82	88	94	101	105	114	125	135		
878	45	60	75	90	97	102	106	109	112	115	112		
880	43	60	76	90	102	114	124	131	138	144	149		
881	25	37	51	67	83	99	109	116	123	130	137		
		16,6	31,8	46,4	56,8	65,6	72,6	78,4	83,6	90,2	95,2		gnstl. vægtførelse pr. dyr.
576	24	37	48	58	66	73	80	85	86	89	91		International Br-standard 0,01 g daglig. Br-ekstrakt 1 cm ³ daglig.
596	32	42	51	58	66	70	73	72	70	65	63		
598	32	45	54	65	73	78	82	86	89	96	99		
600	38	52	57	73	88	98	100	95	97	101	104		
622	36	60	73	80	85	89	90	92	93	94	96		
		14,8	24,2	34,4	43,2	49,2	52,6	53,6	54,6	56,6	58,2		gnstl. vægtførelse pr. dyr.
1005	36	44	51	58	64	69	70	74	78	82	85		International Br-standard 0,0075 g daglig. Br-ekstrakt 1 cm ³ daglig.
1006	36	45	51	55	56	58	62	64	66	68	72		
1007	32	38	44	50	54	58	62	65	68	74	77		
1008	30	39	50	62	72	79	83	87	88	91	94		
1046	32	42	50	56	60	65	69	75	77	75	72		
		8,4	16,0	23,0	28,0	32,6	36,0	39,8	42,2	44,8	46,8		gnstl. vægtførelse pr. dyr.

TABEL 2 (forts.)

Nr.	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	uger	
696	40	42	43	45	44	43	46	47	49	49	52		International Br-standard 0,005 g daglig. Br-ekstrakt 1 cm ³ daglig.
697	43	46	48	49	53	54	58	59	60	58	60		
699	37	36	45	45	44	48	54	56	51	49	48		
700	43	44	44	43	43	45	49	41	40	42	49		
760	38	43	50	50	49	48	47	46	45	44	45		
		2,0	4,8	6,2	6,4	7,4	10,6	9,6	8,8	8,2	10,6		gnstl. vægtforøgelse pr. dyr.
580	45	50	50	52	55	57	58	59	57	59	61		International Br-standard 0,002 g daglig. Br-ekstrakt 1 cm ³ daglig.
581	44	44	48	51	53	55	55	55	59	61	62		
584	49	42	41	35	37	43	46	45	43	39	35		
601	32	37	40	43	42	45	45	44	44	42	42		
768	38	37	34	33	40	35	død.						
		0,4	0,5	0,4	0,9	1,1							gnstl. vægtforøgelse pr. dyr.
585	48	44	41	38	død								International Br-Standard 0,001 g daglig. Br-ekstrakt 1 cm ³ daglig.
586	43	44	47	48	45	42	37	død					
587	36	31	31	34	død								
588	36	38	40	41	34	død							
589	36	35	33	37	39	42	45	40	død				
		÷1,4	÷1,4	÷0,2									gnstl. vægtforøgelse pr. dyr.

TABEL 3.

Nr.	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	uger	
597	25	55	79	100	119	137	145	145	153	157	157	Peters Brækstrakt 1 draabe daglig. Brækstrakt 2 cm ³ daglig.	
602	18	35	59	78	102	131	151	162	170	174	181		
603	23	40	65	86	108	130	147	159	169	178	184		
605	21	40	66	92	114	138	148	154	160	166	175		
630	34	65	88	115	134	140	149	159	167	170	163		
													gnstl. vægtforøgelse pr. dyr.
		22,8	47,2	70,0	91,2	111,0	123,8	131,6	139,6	144,8	147,8		
894	41	60	88	111	131	143	153	166	173	171	177		
896	27	52	77	95	113	130	142	154	159	163	162		
898	36	65	90	114	139	160	172	177	179	180	180		
949	40	67	91	109	130	148	168	187	203	213	225	Peters Brækstrakt 1 draabe daglig. Brækstrakt 1 cm ³ daglig.	
966	34	58	82	100	119	136	149	157	167	177	182		
		24,8	50,0	70,2	90,8	107,8	121,2	132,6	140,6	144,2	149,6		
607	32	54	75	94	113	129	137	141	149	154	157		
609	34	54	72	87	105	117	120	131	138	145	147	Peters Brækstrakt 1 draabe daglig. Brækstrakt 0,5 cm ³ daglig.	
610	33	55	77	97	115	128	138	147	156	168	175		
611	41	67	87	104	121	136	145	151	156	164	164		
631	27	41	56	74	93	108	119	126	135	143	153		
													gnstl. vægtforøgelse pr. dyr.
		20,8	40,0	57,8	76,0	90,2	98,4	105,8	113,4	121,4	125,8		

TABEL 3 (forts.)

Nr.	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	uger	
612	39	57	67	75	83	92	103	113	122	131	136		Peters Brekstrakt 1 dråbe daglig. Brekstrakt 0,2 cm ³ daglig.
613	44	57	64	72	78	86	96	103	111	115	118		
614	37	51	63	67	70	74	79	88	95	105	112		
615	35	46	52	60	70	78	86	94	98	100	103		
616	32	40	48	53	63	74	82	90	98	102	106		
		12,8	21,4	28,0	35,4	43,4	51,8	60,2	67,4	73,2	77,6		gnstl. vægforøgelse pr. dyr.
635	36	43	47	53	61	70	76	79	86	89	92		Peters Brekstrakt 1 dråbe daglig. Brekstrakt 0,1 cm ³ daglig.
636	37	41	47	54	60	61	65	66	71	73	77		
637	24	28	32	36	38	37	46	54	56	58	61		
638	26	30	37	46	55	61	65	66	72	75	78		
639	42	48	55	59	61	64	66	67	70	72	74		
		5,0	10,6	16,6	22,0	25,6	30,6	33,4	38,0	40,4	43,4		gnstl. vægforøgelse pr. dyr.

TABEL 3 (forts.)

Nr.	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	uger	
617	40	43	45	47	48	48	49	51	52	48	44		Peters Brækstrakt 1 draabe daglig. Brækstrakt 0,05 cm ³ daglig. gnstl. vægtforøgelse pr. dyr.
618	30	32	34	35	35	37	39	40	42	44	44		
619	32	39	39	38	39	41	42	43	45	47	47		
620	39	42	46	47	50	52	53	56	54	56	56		
621	37	42	45	46	50	47	52	49	53	57	56		
		4,0	6,2	7,0	8,8	9,4	11,4	12,2	13,6	14,8	13,8		
623	33	36	35	40	39	41	37	38	37	37	36		Peters Brækstrakt 1 draabe daglig. Brækstrakt 0,01 cm ³ daglig. gnstl. vægtforøgelse pr. dyr.
624	36	38	37	36	37	38	38	37	37	36	36		
626	27	32	33	33	35	36	38	38	39	40	38		
629	33	35	38	37	37	36	37	38	38	38	37		
640	36	39	38	38	37	33	37	34	32	30	død		
		3,0	3,2	3,8	4,0	3,8	4,4	4,0	3,6	3,2			

For nøje at kunne afveje de ret smaa mængder standard acid clay, som det her drejer sig om, er standarden blandet op med et indifferent produkt — in casu dekstrin — i forholdet 1 : 10. At dekstrin hverken indeholder B_I - eller B_{II} -vitamin ses af tavle XLVI, der viser, at rotter, der faar dekstrin ad libitum som tillæg til enten B_I - eller B_{II} -vitaminfri kost ikke tager paa i vægt, men hurtigt gaar til grunde. De mindre mængder B_{II} -ekstrakt er tilberedt ved at fortynde vort sædvanlige B_{II} -ekstrakt i forskellige forhold med destilleret vand, hvorefter fortyndingen doseres i den beregnede mængde.

Betrægter vi først vægtkurverne for de rent negative kontroller, ser man, at disse dyr hurtigt tager af i vægt og dør ca. $3\frac{1}{2}$ —4 uger efter, at fodring med den helt B-vitaminfri kost er begyndt.

Ser vi dernæst paa de delvis negative kontrolrotter, har vi her 2 grupper: a) de dyr, der som tillæg til basalkosten har faaet B_{II} -vitaminekstrakt alene — altsaa mangler B_I -vitamin og b) de dyr, der som tillæg til grundkosten har faaet B_I -vitamin-ekstrakt alene — altsaa mangler B_{II} -vitamin. ad a). Disse dyr tager efter doseringen af B_{II} -ekstraktet oftest lidt paa i vægt, men snart falder vægten atter, og de dør $1\frac{1}{2}$ — $4\frac{1}{2}$ uge efter, at tillægget er givet eller 3— $5\frac{1}{2}$ uge efter forperiodens begyndelse. ad b). Naar vi derimod ser vægtkurverne for de dyr, der kun har faaet B_I -vitamintillæg til grundkosten, tager disse sig noget anderledes ud, idet de er ganske anderledes langstrakte i deres forløb; oftest indtræder der en ganske ringe stigning straks efter tillæg af B_I -ekstraktet, men den er forbigaaende, og kurven indstiller sig derefter hurtigt vandret eller omtrent vandret med svagt faldende tendens. Vi har tidligere set eksempler paa nogle kurver fra dyr paa ganske samme régime, hvor vægten faldt noget hurtigere, og dyrene døde tidligere. De her fremstillede 5 kurver er mere langstrakte, og døden indtræder hos 2 af dyrene endog saa sent som 16—17 uger efter, at tillægget er givet.

Hvad kan nu grunden være til, at disse 2 grupper delvis negative kontrollers vægtkurver adskiller sig saa meget fra hinanden? Man kan tænke sig 3 muligheder; enten indeholder grundkosten lidt B_{II} -vitamin, men er fuldstændig rensat for B_I -vitamin, eller ogsaa indeholder B_I -ekstraktet lidt B_{II} -vitamin;

endelig er det ikke umuligt, at rotter trods fuldstændig B_{II}-vitaminmangel, men tilført tilstrækkeligt B_I-vitamin kan klare sig i længere tid end dyr, der faar B_{II}-vitamin, men intet B_I-vitamin.

At det af os fremstillede Peters B_I-vitaminekstrakt intet B_{II}-vitamin indeholder, har vi imidlertid tidligere vist ved at give store doser af dette, hvorved vi ikke har formaaet at fremkalde antydning af vægtforøgelse. Beviset for, at vor grundkost er fuldstændig rensat for B_{II}-vitamin, er vanskeligt at levere, men den er imidlertid godt nok rensat til at gøre den anvendelig til vort formaal; det er imidlertid paafaldende at bemærke, at overalt i vitaminliteraturen, hvor man har beskæftiget sig med fodring af rotter med B-vitaminfri grundkost samt tillæg af B_{II}-fri B_I-vitaminkoncentrater, ser man angivet, at rotterne holder deres vægt konstant gennem nogen tid, før de til sidst tager af i vægt og dør. Om maaske alle vitaminlaboratorier verden over arbejder med en kost, som man ikke har evnet at rense for den sidste B_{II}-vitaminrest, eller B_I-vitamin formaar at holde rotter længere i live end B_{II}-vitamin alene som tillæg til B-vitaminfri grundkost, maa saaledes betragtes som et aabent spørgsmaal.

Ved gennemgang af de følgende kurver ser man tydeligt, at hvor B_{II}-vitaminmængden holdes konstant og B_I-vitaminmængden varieres for grupper af forsøgsdyr ved hjælp af stigende doser af den internationale B_I-vitaminstandard, er vægtkurverne stadig stigende, indtil en vis øverste grænse er naaet. Ganske det analoge forhold paavises, hvis man holder B_I-vitaminmængden konstant og varierer B_{II}-vitamindosis ved hjælp af stigende mængder af vort B_{II}-ekstrakt. Det fremgaar altsaa heraf, at der er en udmærket sammenhæng mellem mængden af det doserede B_I- eller B_{II}-vitamin og vægtkurvernes stejlhed, hvorfor denne maa kunne anvendes til bestemmelse af B_I- og B_{II}-vitaminmængden i eventuelle testoffer, naar de ved hjælp af disse frembragte vægtkurver sammenlignes med de ovenfor gennemgaaede standardvægtkurver.

Det tilsyneladende paradoksale forhold, at den gruppe dyr, som faar sufficient B_I-vitaminmængde og en ganske ringe B_{II}-vitaminmængde, dør hurtigere end de dyr, der slet intet B_{II}-

vitamin faar, maa vistnok betragtes som tilfældigt og vil næppe holde stik, hvis det bliver prøvet paa mange dyr.

Ser man paa kurverne som helhed, maa man sige, at disse forløber ret ensartede, selv om man naturligvis som ved ethvert biologisk forsøg maa regne med visse uregelmæssigheder. Disse maa dog ved de nævnte forsøg betegnes som ret smaa tydende paa, at dyrene er vel standardiserede.

2. *Svingninger i kostmængden hos dyr paa samme B-vitaminsdosis.*

Da saavel B_I- som B_{II}-vitaminmangel formindsker dyrenes appetit, vil det være af interesse at foretage maalinge af den af dyrene daglig indtagne fødemængde for om muligt herigennem at forsøge at faa klarlagt, om denne fødemængde muligvis forløber parallelt med vægtstigningen og eventuelt vil kunne anvendes som et maal for teststoffets B-vitaminmængde.

Desværre fik vi først forholdsvis sent under udførelsen af disse forsøg øjet op for vigtigheden af dette problem, hvorfor kosten kun for forholdsvis faa grupper dyr er maalt gennem hele forsøgsperioden. Derimod har vi i de første 2 uger af forsøgsperioden maalt kostmængden for en stor del af grupperne for at undersøge, om den af dyr i samme gruppe daglig indtagne mængde basalkost varierede nævneværdigt. Da disse kostmaalinger, som angivet, kun strakte sig over de første uger af forsøgsperioden, hvor vægtforøgelsen er noget mere uregelmæssig end senere, kan resultaterne af disse maalinger ikke anvendes i førstnævnte øjemed.

For 4 grupper dyr — 2 paa B_I-vitaminsdoser og 2 paa B_{II}-vitaminsdoser — er kostmaalingerne imidlertid af længere udstrækning. Disse kostmaalinger skal nu gennemgaaes og samtidig sammenlignes med de af dyrene opnaaede vægtforøgelser.

TABEL 4.

Stor dosis B₁₂-vitamin (0,03 g af internat. standard dgl.).

Kostmængde pr. uge.

	Nr. 984	Nr. 985	Nr. 986	Nr. 987	Nr. 988			
1. uge	39 g	34 g	34 g	33 g	36 g	max. differ.	3	g
2. »	44 g	44 g	47 g	42 g	47 g	—	—	5 g
3. »	52 g	51 g	57 g	49 g	58 g	—	—	7 g
4. »	63 g	57 g	59 g	53 g	62 g	—	—	10 g
5. »	63 g	73 g	67 g	62 g	69 g	—	—	11 g
6. »	64 g	78 g	69 g	69 g	74 g	—	—	14 g
7. »	63 g	74 g	74 g	72 g	77 g	—	—	14 g
8. »	66 g	74 g	59 g	71 g	77 g	—	—	18 g
	454 g	485 g	466 g	451 g	500 g	max. differ.	49	g
Gnstl. kostmængde pr. Uge	57 g	61 g	58 g	56 g	63 g	—	—	7 g
Vægt- forøgelse for 8 uger	146 g	136 g	157 g	166 g	157 g			

Lille dosis B₁₂-vitamin (0,0075 g af internat. standard dgl.).

Kostmængde pr. uge.

	Nr. 1005	Nr. 1006	Nr. 1007	Nr. 1008	Nr. 1046			
1. uge	28 g	32 g	33 g	28 g	26 g	max. differ.	7	g
2. »	23 g	33 g	27 g	30 g	28 g	—	—	10 g
3. »	28 g	29 g	25 g	35 g	31 g	—	—	7 g
4. »	31 g	29 g	26 g	36 g	29 g	—	—	10 g
5. »	30 g	22 g	26 g	39 g	31 g	—	—	17 g
6. »	29 g	29 g	26 g	39 g	26 g	—	—	13 g
7. »	27 g	29 g	29 g	35 g	31 g	—	—	8 g
8. »	27 g	35 g	26 g	35 g	30 g	—	—	9 g
	223 g	238 g	218 g	277 g	232 g	max. differ.	59	g
Gnstl. kostmængde pr. Uge	28 g	30 g	27 g	35 g	29 g	—	—	8 g
Vægt- forøgelse for 8 uger	42 g	30 g	36 g	58 g	45 g			

TABEL 5.

Stor dosis B₁₂-vitamin (1 cm³ B₁₂-vitaminekstrakt dgl.).

Kostmængde pr. uge.

	Nr. 894	Nr. 896	Nr. 898	Nr. 949	Nr. 966			
1. uge	40 g	40 g	45 g	41 g	40 g	max. differ.	5 g	
2. »	60 g	53 g	61 g	54 g	51 g	—	—	10 g
3. »	72 g	60 g	69 g	58 g	64 g	—	—	14 g
4. »	79 g	59 g	75 g	64 g	61 g	—	—	20 g
5. »	69 g	65 g	86 g	66 g	72 g	—	—	21 g
	320 g	277 g	336 g	283 g	288 g	max. differ.	59 g	
Gnstl. kostmængde pr. Uge	64 g	56 g	67 g	57 g	58 g	—	—	11 g
Vægt- forøgelse for 8 uger	102 g	103 g	124 g	108 g	102 g			

Lille dosis B₁₂-vitamin (0,2 cm³ B₁₂-vitaminekstrakt dgl.).

Kostmængde pr. uge.

	Nr. 977	Nr. 978	Nr. 981	Nr. 982	Nr. 983			
1. uge	32 g	33 g	32 g	30 g	29 g	max. differ.	4 g	
2. »	31 g	39 g	31 g	32 g	29 g	—	—	10 g
3. »	35 g	54 g	33 g	34 g	34 g	—	—	21 g
4. »	42 g	45 g	37 g	38 g	39 g	—	—	8 g
5. »	42 g	42 g	37 g	40 g	40 g	—	—	5 g
	182 g	213 g	170 g	174 g	171 g	max. differ.	43 g	
Gnstl. kostmængde pr. Uge	36 g	43 g	34 g	35 g	34 g	—	—	9 g
Vægt- forøgelse for 8 uger	38 g	54 g	36 g	40 g	44 g			

Ved betragtning af tabellerne ser man, at der er en temmelig stor forskel paa den mængde basalkost, dyrene ugentlig spiser paa samme B₁₂- eller B₁₂-vitamindosis. Endvidere fremgaar det, at det ingenlunde altid er de dyr, der indtager størst mængde basalkost, som tager mest paa i vægt indenfor en bestemt tid. Dette sidste gælder ligeledes for saavel B₁₂- som for B₁₂-vitamin-

dosering. Det er derfor tvivlsomt, om den i indledningen nævnte modifikation »the paired feeding method« forøger rottevækst-metodens nøjagtighed ved at bringe dyrene til parvis at indtage nøjagtig samme mængde kost. Naar denne metode ikke er forsøgt, skyldes det imidlertid, at den synes at være saa besværlig og tidsrøvende, at den ikke opfylder de af os tidligere opstillede betingelser for anvendelighed.

Det er imidlertid næppe sandsynligt, at man gennem kostkurver opnaaet ved daglige kostvejninger skulde faa en nøjagtigere metode til B-vitaminbestemmelser end gennem maaling af dyrenes vægtforøgelse, thi selv om den indtagne fødemængde eventuelt skulde vise sig at være en mere direkte funktion af vitaminmængden end dyrenes vægtforøgelse, er bestemmelsen af denne første langt unøjagtigere end vejningen af dyrene, samtidig med at den volder meget mere besvær og er overordentlig tidsrøvende.

3. *Holdbarheden af den internationale B_I-vitamin-standard samt af vort B_{II}-vitaminekstrakt.*

I literaturen findes adskillige angivelser over den store holdbarhed, som den internationale B_I-vitaminstandard er i besiddelse af (se saaledes Chick og Jackson 1932). Nogen international anerkendt standard for B_{II}-vitamin eksisterer, som tidligere nævnt, ikke endnu. Angaaende holdbarheden af bestemte B_{II}-vitaminekstrakter foreligger intet; derimod véd man, at jo mere koncentreret B_{II}-vitaminet bliver under dettes renfremstilling, desto mere paavirkeligt bliver det for varme og lys, saaledes at det postulerede rene B_{II}-vitamin — flavin — er et meget ustabilt stof. At anvende dette som B_{II}-vitaminstandard vil derfor være upraktisk.

For at afgøre dels holdbarheden af en af de prøver af den internationale B_I-vitaminstandard, der har staaet til vor disposition, dels det af os som B_{II}-vitaminkilde anvendte B_{II}-ekstrakt undersøges disse præparationer efter 1 aars opbevaring; Jansens acid clay preparation er opbevaret i tillukket glas i mørke ved stuetemperatur, og B_{II}-ekstraktet under sterile kauteler i kolbe med overbundet vatprop ligeledes ved stuetemperatur. 1 aar efter forrige dosering af en portion af samme præparationer do-

seres disse atter; for B_I-vitaminets vedkommende gives den internationale enhed—0,01 g standard —, af B_{II}-vitaminekstraktet gives 0,2 cm³ daglig hvert til en gruppe paa 5 3-ugers hanrotter. Paa tavle XXXI og XL ses vægtkurverne for de oprindelige prøvedoseringer af henholdsvis 0,01 g B_I-standard og 0,2 cm³ B_{II}-ekstrakt. Paa tavle XLVII og XLIX ses de tilsvarende kurver opnaaet efter 1 aars opbevaring af de nævnte præparationer, og paa den nedenfor anførte tabel ses de tilsvarende vægte opnoteret.

Det fremgaar heraf, at værdierne for saavel B_I-standarden som for B_{II}-ekstraktet er af fuldstændig samme størrelsesorden ved den tidligere undersøgelse som efter 1 aars opbevaring; heraf følger, at man formentlig ikke ved standardiseringsforsøg nu og da behøver at indskyde maalingen hverken af den internationale standard eller af vort B_{II}-vitaminekstrakt, saa længe disses fremstillingsteknik holdes konstant.

4. *Forsøg over alderens og begyndelsesvægtens betydning hos vore forsøgsdyr for de gennem disses vægtkurver opnaaede resultater.*

For at undersøge dels om rotternes alder ved forsøgsperiodens begyndelse dels om rotternes vægt enten ved forperiodens eller ved forsøgsperiodens begyndelse spiller nogen større rolle for det opnaaede kvantitative resultat, gøres følgende forsøg:

Der udvælges en del rotteunger med bestemte egenskaber, nemlig smaa og store 3 uger gamle og smaa og store 4 uger gamle dyr. Alle disse faar vor sædvanlige B-vitaminfri grundkost med tillæg af sufficient B_{II}-vitaminmængde som autoklavet gærekstrakt. Til alle dyrene gives endvidere samme mængde B_I-vitamin nemlig international enhed af standard acid clay daglig, og vægtforøgelsen bestemmes efter 5 ugers forløb. Dette er, som vi tidligere har set i dette kapitel, allerede udført ved henholdsvis 5 3 ugers rotter for den internationale standard og ved 5 3-ugers rotter for samme standardprøve aaret efter. Disse 2 dyregrupper medtages i nedenstaaende opstilling.

Materialet inddeles derefter i 2 grupper 3-ugers og 4-ugers dyr; indenfor hver af disse grupper ordnes dyrene efter stigende 5 ugers vægtforøgelse, hvorefter man undersøger følgende fak-

TABEL 6.

Nr.	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	uger
576	24	37	48	58	66	73	80	85	86	89	91	Internat. standard 0,01 g dgl. Bir-ekstrakt 1 cm ³ dgl.
596	32	42	51	58	66	70	73	72	70	65	63	
598	32	45	54	65	73	78	82	86	89	96	99	
600	38	52	57	73	88	98	100	95	97	101	104	
622	36	60	73	80	85	89	90	92	93	94	96	
		14,8	12,1	11,5	10,8	9,8	8,8	7,7	6,8	6,3	5,8	gnstl. vægforøgelse pr. dyr pr. uge.
864	44	55	68	79	88	92	98	101	103	111	120	
866	42	57	68	76	83	92	98	102	107	112	118	
867	33	46	57	68	76	85	89	96	99	104	108	
868	26	35	45	53	61	69	75	81	85	87	87	
870	42	50	58	67	71	77	78	75	75	82	86	Internat. standard (1aar gl.) 0,01 g dgl. Bir-ekstrakt 1 cm ³ dgl.
		11,2	10,9	10,4	9,6	9,5	8,4	7,7	7,1	6,9	6,6	
												gnstl. vægforøgelse pr. dyr pr. uge.

Nr.	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	uger
612	39	57	67	75	83	92	103	113	122	131	136	{
613	44	57	64	72	78	86	96	103	111	115	118	
614	37	51	63	67	70	74	79	88	95	105	112	
615	35	46	52	60	70	78	86	94	98	100	103	
616	32	40	48	53	63	74	82	90	98	102	106	
	12,8	10,7	9,3	8,9	8,7	8,6	8,6	8,4	8,1	7,8		
977	27	37	44	51	57	65	74	83	90	96	101	{
978	33	45	55	66	76	87	96	107	119	126	132	
981	31	41	50	58	62	67	74	86	94	101	105	
982	30	38	48	56	63	70	78	86	92	100	106	
983	34	43	53	62	69	78	89	98	105	111	116	
	9,8	9,5	9,2	8,6	8,5	8,5	8,5	8,7	8,6	8,4	8,1	

gnstl. vægtforøgelse pr. dyr pr. uge.

torers fordeling i materialet, nemlig 1) vægten ved forperiodens begyndelse, 2) vægten ved forsøgsperiodens begyndelse samt 3) forperiodens varighed.

Saaledes opstillet tager vort materiale sig ud, som det fremgaar af efterfølgende tabeller:

TABEL 7.

Rotter 3 uger gamle ved forperiodens begyndelse.

5 ugers vægtforøgelse	Vægt ved for- periodens begyndelse	Vægt ved*for- søgsperiodens begyndelse	Forperiodens varighed
30 g	35 g	43 g	14 dage
35 g	34 g	42 g	19 —
37 g	16 g	17 g	24 —
38 g	29 g	32 g	14 —
38 g	24 g	38 g	18 —
39 g	37 g	49 g	12 —
43 g	21 g	26 g	18 —
43 g	37 g	37 g	16 —
46 g	26 g	32 g	23 —
46 g	34 g	42 g	12 —
48 g	32 g	44 g	21 —
50 g	22 g	23 g	24 —
50 g	21 g	32 g	15 —
50 g	30 g	42 g	19 —
52 g	29 g	33 g	21 —
52 g	25 g	26 g	20 —
53 g	35 g	36 g	14 —
56 g	23 g	33 g	15 —
58 g	22 g	22 g	12 —
60 g	31 g	38 g	18 —
64 g	37 g	41 g	17 —

Man ser saaledes, at de dyr, der er 3 uger gamle ved forperiodens begyndelse, har middelvægtforøgelsen 47,0 g med spredningen 8,8 g. Det enkelte dyrs vægtforøgelse synes ikke at staa i nogen som helst relation til dets vægt ved begyndelsen af forperioden eller forsøgsperioden; ej heller forperiodens varighed synes at have nogen indflydelse.

De dyr, der er 4 uger gamle ved forperiodens begyndelse har en væsentlig lavere middelvægtsforøgelse end 3 ugers dyrene, nemlig 29,1 g, med spredningen 12,1 g; forskellen mellem de 2

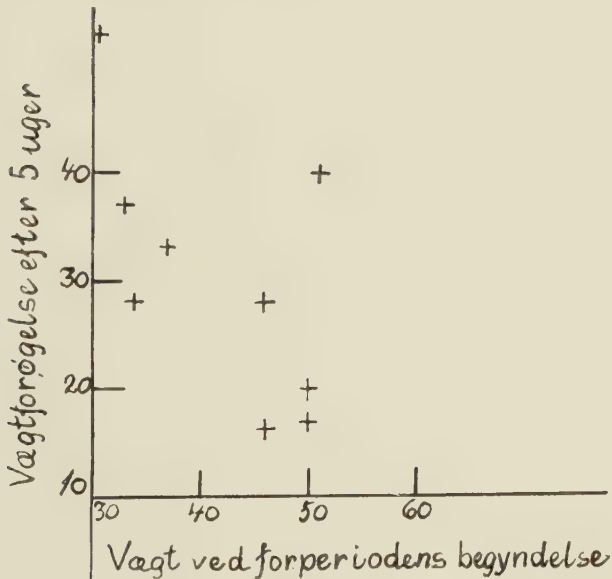
TABEL 8.

Rotter 4 uger gamle ved forperiodens begyndelse.

5 ugers vægtforøgelse	Vægt ved for- periodens begyndelse	Vægt ved for- søgsperiodens begyndelse	Forperiodens varighed
16 g	46 g	46 g	18 dage
17 g	50 g	65 g	20 —
20 g	50 g	63 g	17 —
28 g	46 g	59 g	15 —
28 g	34 g	48 g	16 —
33 g	37 g	48 g	16 —
37 g	33 g	46 g	19 —
40 g	51 g	55 g	20 —
53 g	30 g	37 g	16 —

grupperes middelvægtforøgelser 18 g er 4 gange sin middelfejl. Materialet er for begrænset til at sige noget afgørende om det enkelte dyrs vægtforøgelse i forhold til de 3 andre varianter, men som det vedføjede diagram illustrerer, vokser de mindre dyr dog muligvis hurtigst. Det er derfor muligt, at man maa nøjes med at sige, at 3 ugers dyrene vokser hurtigere end de mindre 4 ugers dyr.

Den praktiske konklusion heraf bliver, at 3 ugers dyrene for-



mentlig er mere velegnede til forsøgene end 4 ugers dyrene, idet de i hvert fald for den her prøvede dosis synes mest uafhængige af de tidligere nævnte ydre forhold nemlig vægtene ved forperiodens og forsøgsperiodens begyndelse og forperiodens varighed.

5. *Hvilke dele af B-vitaminskomplekset kan bestemmes gennem anvendelse af vore standardkurver?*

Vedrørende den nærmere udregning angaaende et teststofs B_I- eller B_{II}-vitaminpotens maa henvises til det følgende kapitel; derimod skal vi her beskæftige os med, hvilke B-vitaminfaktorer man ved hjælp af vore standardkurver egentlig er i stand til at bestemme.

Naar vi giver vor basalkost med tillæg af B_{II}-vitaminekstraktet, maa vi regne med, at den bestemmelse, vi foretager ved undersøgelse af et teststof, bliver dets indhold af B_I + B_{IV}-vitaminer; thi vort B_{II}-ekstrakt, som er autoklaveret i surt milieu, hvorved alt det termolabile B_I- og B_{IV}-vitamin destrueres, indeholder stadig Y-faktoren, da denne angiveligt først destrueres ved autoklavering ved alkalisk reaktion. Naturligvis vilde det være at foretrække, saafremt man foruden tilstedeværelsen af B_{II}-vitamin og Y-faktor tillige kunde sørge for tilskud af B_{IV}-vitamin i sufficient mængde, da bestemmelsen derved alene vilde give teststoffets B_I-vitaminværdi; fremstilling af B_{IV}-vitaminpræparater uden B_I-vitamintilblanding er imidlertid endnu aldrig helt lykkedes, og noget saadant har vi ej heller forsøgt.

Ved de undersøgelser, hvor vi som tillæg til basalkosten giver Peters antineuritiske koncentrat, viser de opnaaede værdier antagelig teststoffets indhold af B_{II}-vitamin + Y-faktor. Thi Peters ekstrakt indeholder foruden B_I-vitamin tillige en del B_{IV}-vitamin, da den tidligere beskrevne fældning med Hopkins reagens, hvorved foruden en del æggehvdestoffer ogsaa en del B_{IV}-vitamin fældes, langt fra er komplet. Teoretisk foreligger muligheden for at kunne bestemme disse faktorer særskilt, da man kender eller kan fremstille præparationer, som kun indeholder en af disse, altsaa enten B_{II}-vitamin eller Y-faktor. F. eks. findes kun B_{II}-vitamin i hønseæggehvide, og omvendt skal efter

kraftig autoklavering af gærekstrakt i alkalisk milieu B_{II}-vitaminet destrueres efterladende Y-faktoren uskadt. I praksis vil det imidlertid sikkert vise sig, at forskellige forhold af betydning vil virke generende. Som vi senere skal se, optræder der ofte hos rotter, der faar tilskud af æggehvidepræparationer, en dermatitisform, meget mindende om pellagra; disse dyr bliver ligeledes paa anden maade syge, hvilket bl. a. viser sig ved ringere vægttiltagen; om dette skyldes giftighed af æggehviden eller Y-faktormangel, er vanskeligt at afgøre.

Hvis de for nylig af Kuhn og medarbejdere fremstillede flavinekstrakter viser sig at bestaa af rent B_{II}-vitamin uden Y-faktortilblanding, hvilket endnu ikke er fastslaaet, vil man kunne bruge disse ekstrakter paa den maade, at man først ved hjælp af disse bestemmer et stofs Y-faktorindhold, dernæst paa vor sædvanlige maade stoffets B_{II} + Y-indhold, hvorefter B_{II}-indholdet kan udregnes. Til Y-faktoren kender man imidlertid paa nuværende tidspunkt saa lidt, at man foreløbig, indtil dette kendskab er betydelig udvidet, maa nøjes med at arbejde med B_{II} + Y-faktor som et samlet hele. (For nylig angiver O'Brien (1934) i et arbejde om B_{III}-vitaminundersøgelser, at Peters antineuritiske ekstrakt formodentlig indeholder Y-faktor; er dette rigtigt, giver de med vor metode foretagne bestemmelser altsaa alene B_{II}-vitaminværdien af teststoffet; O'Briens antagelse er imidlertid ikke nærmere dokumenteret, og der er intet anført, som støtter rigtigheden heraf).

Vi maa altsaa saaledes regne med gennem undersøgelser med den foreslaaede metode at foretage 2 bestemmelser: dels en B_I + B_{IV}-analyse, dels en B_{II} + Y-analyse, dog naturligvis forudsat, at B_{IV}-vitaminet og Y-faktoren virkelig eksisterer og opfylder de for disse i literaturen angivne karakteristiske egenskaber.

6. *Forskellige vanskeligheder, der kan opstaa, under udførelsen af B_I- og B_{II}-vitaminbestemmelse ved hjælp af rotterækst-metoden.*

Vi skal senere se eksempler fra praksis paa, hvilke vanskeligheder man kan komme ud for ved forsøg paa at bestemme B-vitaminmængden i stoffer, hvor B-vitaminet er sparsomt til

stede. I saa fald optræder hos rotterne kun meget ringe vægtforøgelse ved indtagen af endog betydelige mængder af teststoffet; men desuden viser det sig ofte, at nogle af dyrene kan bringes til at spise saa meget teststof, at de netop bliver anvendelige til formaålet, medens en del ikke vil spise nok og derfor ikke kan bruges. Vi har til anvendelse i saadanne tilfælde, som her skitseret, overvejet en anden fremgangsmaade, som vi ikke har forsøgt, men som muligvis kan faa betydning. Forslaget gaar ud paa at give en gruppe dyr et bestemt, mindre tilskud af B-vitamin, som i sig selv giver en passende vægtstigning og samtidig til en anden gruppe foruden samme mængde B-vitamin at give teststoffet i doser, som man er sikker paa ikke er større, end at alle gruppens dyr spiser op. Forskellen paa vægtforøgelse for de 2 grupper dyr i et bestemt tidsrum maa da skyldes B-vitaminindholdet i vedkommende teststof, hvorfor beregningen af dette let maa kunne udføres.

En anden mulighed til afhjælpning af ovennævnte forhold vilde være at foretage en ekstraktion af teststoffet med efterfølgende koncentrering. Denne fremgangsmaade maa ligeledes være formaalstjenlig, hvis teststoffet af en eller anden grund, f. eks. daarlig eller irriterende smag eller giftighed ikke bør gives til rotterne i sin oprindelige form. I saa fald maa man sørge for ekstraktions- eller adsorptionsmidler, der kvantitativt tager sig af hele B-vitaminkomplekset, hvilket næppe altid er muligt.

En betydelig usikkerhed, som i nogle tilfælde er vanskelig at borteliminere, fremkommer, naar teststoffet samtidig med kun at indeholde lidt B-vitamin er et godt næringsmiddel kaloriemæssigt set. Dyrene maa da for at skaffe sig tilstrækkeligt B-vitamin til opnaaelse af god vækst spise større mængder af dette, idet testdosis nødvendigvis maa vælges ret stor; det er imidlertid indlysende, at disse dyr herigennem faar deres kost forandret, saaledes at dette i nogle tilfælde maa kunne influere betydeligt paa vægten og forarsage, at disse dyrs vægtkurver ikke direkte kan sammenlignes med vægtkurver fra dyr, der faar grundkost + B-vitamin i koncentreret form. Dette er en ulempe, som man maa have in mente, og forsøg paa at undgaa

denne, kan tænkes udført ved enten at anvende de ovenfor skitserede fremgangsmaader eller at blande teststoffet med basalkosten i bestemte mængdeforhold, saaledes at teststoffet nøjagtig erstatter ækvivalente mængder protein, fedt og kulhydrat i denne; dette kræver imidlertid analyser af teststoffet, hvilket i høj grad komplicerer metoden.

IV. Kapitel.

SAMMENLIGNENDE STATISTISKE VURDERINGER AF NOGLE FORSKELLIGE MAALEMETODER FOR B-VITAMIN.

1. Indledende bemærkninger.

Antager man, at udelukkende den rene vitaminmængde i et præparat er ansvarlig for en vis middelreaktion paa en samling ensartede dyr (helbredelsesprocent, middelvarighed af helbredelserne, middelvægtforøgelsen i en given tid), saa vil a gram af et vitaminpræparat være ækvivalent med $\frac{a}{k}$ gram, af et andet præparat, som er k gange saa stærkt, d. v. s. indeholder k gange saa meget rent vitamin pr. gram. Tegner man for hvert præparat den kurve, der angiver middelreaktionerne som funktion af logaritmen til doserne, vil de 2 kurver blive parallelle og have afstanden $\log k$. *Under den anførte forudsætning bliver altsaa i sammenlignelige forsøg (samme dyrebestand, samme grundkost etc.) de logaritmiske reaktionskurver for alle vitaminpræparater parallelle, og antilogaritmen til afstanden mellem 2 kurver angiver styrkeforholdet mellem 2 tilsvarende vitaminpræparater.*

Den logaritmiske reaktionskurve kan ofte over en betydelig strækning approksimeres tilstrækkelig godt af en ret linie. Har man anstillet en række forsøg med forskellige præparater og brugt flere doser for hvert præparat, kan linien konstrueres paa følgende maade: For hvert præparat dannes middeltallet af saavel logaritmerne til doserne som reaktionerne, og disse 2 middeltal subtraheres fra henholdsvis de enkelte dosers logaritmer og de enkelte reaktioner. De derved fremkomne tal tegnes nu for alle præparaterne ind i et koordinatsystem, gennem hvis nul-

punkt man da skal lægge den bedst mulige linie mellem punkterne. Den kan selvfølgelig lægges paa mange maader, alt efter definitionen paa »bedst mulig«. I farmakologiske bestemmelser lægger man i almindelighed enten grafisk eller ved hjælp af de mindste kvadraters metode linien saaledes, at punkterne afviger mindst muligt fra denne i retningen parallel med ordinataksen (reaktionsaksen); dermed har man lagt vægt paa, at linien saa tro som muligt gengiver reaktionerne bestemt ved doserne. Det, man vil bruge linien til, er imidlertid som oftest det omvendte, nemlig at bestemme størrelsen af en dosis ud fra den reaktion, den fremkalder. Fra denne side set er det rigtigere at bestemme linien, saa den slutter sig bedst muligt til punkterne i retningen parallel med abscisseaksen (dosisaksen). Ikke blot teoretisk, men ogsaa i praksis kan der være en del forskel paa de 2 linier, og i hvert fald bør den sidste linie lægges til grund ved vurderingen af fejlen paa bestemmelsen af en dosis. Principielt bør man forkaste den fejlvurdering, der ret almindeligt foretages paa grundlag af den første linie, som oven i købet ofte forudsættes fejlfri.

Hvor oplysningerne i et materiale er tilstrækkelig detaljerede, bør man efter at have beregnet middelfejlen paa en dosis undersøge, om dosernes afvigelse fra de sande værdier følger den normale fordelingslov. I vort eget materiale viser det sig ikke at være tilfældet, idet fordelingen, som vi senere skal se, har 2 toppe; det samme gælder maaske Birch og Harris' materiale med bradycardimetoden. I saadanne tilfælde bør det saavidt muligt undersøges, om materialet i en eller anden biologisk henseende kan deles i 2 væsentligt forskellige grupper.

I de øvrige materialer, der omtales i det følgende, er fordelings overensstemmelse med den normale tilfredsstillende. Som et særligt smukt eksempel kan anføres fordelingen fra Birch og Harris' forsøg med kramper hos rotter:

Afvigelser divideret med σ i intervallerne ¹⁾	Antal	
	fundet	beregnet
$\leq \div 2,5$	1	0,3
$\div 2,5 \text{ — } \div 2,0$	0	0,8
$\div 2,0 \text{ — } \div 1,5$	3	2,2
$\div 1,5 \text{ — } \div 1,0$	2	4,7
$\div 1,0 \text{ — } \div 0,5$	8	7,6
$\div 0,5 \text{ — } 0,0$	8	9,8
$0,0 \text{ — } 0,5$	9	9,8
$0,5 \text{ — } 1,0$	7	7,6
$1,0 \text{ — } 1,5$	8	4,7
$1,5 \text{ — } 2,0$	3	2,2
$2,0 \text{ — } 2,5$	1	0,8
$> 2,5$	1	0,3
	51	50,8

2. Andres arbejder.

I sammenhæng med vurderingen af vore egne resultater diskuterer vi de 2 eneste arbejder, hvor en bestemmelse af de anvendte metoders fejlgrænser er forsøgt, nemlig de tidligere nævnte arbejder af Coward et al. samt Birch og Harris.

A. Duer. Kurativ metode (Coward et al.).

Angaaende forsøgsdyrenes beskaffenhed oplyses, at de ikke hidrører fra eget stutteri, men fra en handlende, som leverer 30 ad gangen. Duerne vejer mellem 300 og 450 g. Antallet af anvendelige duer (d. v. s. som faar opistotonus) varierer meget stærkt i løbet af de $2\frac{1}{2}$ aar, forsøgene strækker sig over, nemlig mellem 19 og 69 %; tilsammen udgør de 45 %. Da man maaske maa vente, at lignende stærke variationer ogsaa finder sted i den lethed, hvormed dyrene helbredes, er der en fare for, at resultaterne fra de forskellige tidspunkter ikke kan sammenlignes umiddelbart; ved en endelig vurdering af metodens sikkerhed skulde derfor bl. a. forsøgenes udfald i hver enkelt maaned tages med i betragtning. Den vurdering, der forsøges i det følgende, maa derfor tages med et vist forbehold.

Om forsøgstekniken oplyses bl. a., at man har anset et par

¹⁾ f. eks. $0,5 \text{ — } 1,0$ betegner $0,50 \text{ — } 0,99$.

af Peters forholdsregler (forsøg paa standardisering af duerne med en bestemt kost samt anvendelse af vaskede ris) for overflødige; det virker lidt overraskende, at dette begrundes med, at antallet af anvendelige duer ogsaa i Peters laboratorium alt i alt er ca. 45 %.

a. Helbredelsesvarighed. I forff.s¹ udregning af helbredelsernes middelfarighed er der indløbet en fejl, idet de duer, der har faaet en dosis, som viste sig utilstrækkelig til helbredelse, er udeladt; de bør naturligvis tælles med, idet varigheden af deres helbredelse regnes = 0.

I vedføjede tabel nr. 9 er bl. a. forff.s angivelser af forskellige præparaters styrkeforhold sammenstillet med de berigtigede værdier, som i hvert fald ikke varierer slet saa drastisk. Forøvrigt forudsætter denne beregning, at helbredelsernes middelfarighed er proportional med vitamindosen, og dette er, som forff. bemærker, ikke tilfældet. *Naar man undtager et af præparaterne (»vitamin Br-solution«), viser den logaritmiske reaktionskurve derimod ingen systematiske afvigelser fra at være en ret linie med hældningen 0,170 mod reaktionsaksen.* At forff. ikke har kunnet konstatere en saadan afhængighed, ligger i omtalte fejl.

TABEL 9.

Præparat	Dosis	Standardenheder pr. g. ell. cm ³	
		Ifølge forff.	Berigtiget
Aktiveret acid clay 1.	0,015 g	357	185
	0,03 g	176	174
	0,06 g	104	174
	0,12 g	91	124
Aktiveret acid clay 2. (standard)	0,03 g	100	100
Tørgær	0,031 g	207	53
	0,062 g	41	26
	0,125 g	50	76
	0,250 g	34	56
»Vitamin Br-solution«	0,1 cm ³	29	18
	0,2 cm ³	13	15
	0,25 cm ³	11,4	15
	0,35 cm ³	10	15

Præparat	Dosis	Standardenheder pr. g. ell. cm ³	
		Ifølge forff.	Berigtiget
Risskalekstrakt.	0,25 cm ³	9	12
	0,5 cm ³	14	25
	1,0 cm ³	8	15
	2,0 cm ³	5,3	9
Gærekstrakt.	0,12 cm ³	20	12
	0,24 cm ³	20	32

Middelfejlen paa bestemmelsen af logaritmen til en dosis er $\sigma = 0,37$, naar kun 1 dyr er anvendt. Til beregningen af σ har kun middelfejlgrænserne været til raadighed; en beregning paa grundlag af de enkelte varigheder vilde selvfølgelig være sikrere. Anvendes n dyr, er middelfejlen $E_n = 0,37 : \sqrt{n}$. For $n = 10$ finder man fejlgrænserne $\div 42\%$ og $+ 71\%$ paa selve vitamindosen svarende til $\pm 2 \times$ middelfejlen paa dens logaritme; forff. beregner de analoge fejlgrænser til $\div 65\%$ og $+ 125\%$ og undervurderer altsaa metoden en del.

b. Helbredelsesprocent. Det er paa forhaand klart, at den logaritmiske reaktionskurve ikke i hele sit forløb kan være en ret linie. Præparaternes styrke er bestemt med tilnærmelse ved at forudsætte, at kurven er retliniet for helbredelsesprocenter mellem 25 og 75. Idet doserne af de forskellige præparater derved reduceres til doser af standardpræparatet, kan alle overlevelsescenterne indtegnes i koordinatsystemet. Punkterne ligger i et S-formet baand. Man kan med Trevan forudsætte, at den logaritmiske reaktionskurve er arealkurven til den normale fordelingskurve og med Gaddum transformere bestemmelsen af den over i bestemmelsen af en ret linie. Da den teoretiske begrundelse af beregningstekniken, ikke mindst fejlvurderingen, lader en del tilbage at ønske, skal metoden ikke omtales nærmere her. Middelfejlen paa logaritmen til en dosis skønnes til 0,30—0,40, altsaa af samme størrelsesorden som for den foregaaende metode.

B. Rotter. Vægtforøgelse. (Coward et al., Birch og Harris).

a. 3 uger. (Coward et al.).

Forff. beregner de praktiske fejlgrænser til $\div 22\%$ og $+ 30\%$ af en vitamindosis, naar der bruges 4 dyr; grænserne sva-

rer til $2 \times$ middelfejlen paa vægtforøgelse-ernes afvigelser fra deres respektive middeltal.

Da præparaternes styrke bestemmes ud fra en vis kontinuert reaktionskurve, er det imidlertid ikke denne middelfejl, der skal bruges, men middelfejlen paa vægtforøgelse-ernes afvigelser fra de værdier, der svarer til kurven. Punkterne ligger ikke særlig tæt op ad den, og derfor bliver variationsgrænserne sikkert en del større. Da de originale data ikke er anført, kan beregningen af dem ikke foretages.

b. 3 uger. (Birch og Harris).

Middelvægtforøgelserne synes undtagen for den største dosis (0,035 g acid clay) at slutte sig ret nøje til en kontinuert kurve. For at faa et skøn over metodens fejlgrænser, lægges derfor middelfejlen paa vægtforøgelse-ernes afvigelser fra deres respektive middeltal til grund.

Grænserne varierer ret stærkt med dosis: fra $\div 9 \%$ og $+ 10 \%$ for 0,007 g acid clay til $\div 24 \%$ og $+ 32 \%$ for 0,025 g (grænserne svarer til $3 \times$ middelfejlen), naar der anvendes 5 dyr. Denne vurdering fremsættes dog kun med et vist forbehold, da det er muligt, at forsøg med flere doser vil vise, at de forhaandenværende punkter afviger en hel del fra den rigtige kurve.

C. Rotter. Kurative metoder. (Birch og Harris).

a. Bradycardi.

Med Hensyn til forsøgstekniken bemærkes, at hvis en dosis ikke foraarsager forøgelse af rytmen, forsøges en større dosis. Dyret bør da noteres for 0 dages helbredelse; da det ikke er gjort, er det uvist, om f. eks. middelvarigheden af helbredelse for den laveste dosis acid clay (0,01 g) virkelig er den anførte $1\frac{1}{2}$ dag (1 dyr), eller om der har været andre dyr med helbredelsestiden 0. Yderligere er det muligt, at de dyr, der har faaet 0,02 g, indbefatter en gruppe særligt udvalgte nemlig de, der ikke helbredes af 0,01 g.

Forff.s beregninger af nogle præparaters styrke bygger paa en reaktionskurve, der er tegnet paa grundlag af omtalte $1\frac{1}{2}$ dag for 0,01 g acid clay, 6 dage for 0,04 g ligeledes med 1 dyr, samt $3\frac{1}{2}$ dage for 0,02 g med 5 dyr. Udnyttes alle data, og ser man bort fra de omtalte usikkerhedsmomenter, finder man den loga-

ritmiske reaktionskurve fremstillet ved en ret linie med hældningen 0,146 mod reaktionsaksen. Ved beregningen af middelfejlen paa en enkelt bestemmelse af logaritmen til en vitamin-dosis er det her muligt at lægge de enkelte dyrs helbredelsestider til grund; man finder $\sigma = 0,107$. Med 5 dyr er fejlgrænserne for selve dosen $\div 30\%$ og $+ 40\%$, svarende til $3 \times$ middelfejlen for logaritmen.

b. Kramper.

Ogsaa her suppleres en ikke-helbredende dosis med endnu en, men her øver det næppe nogen indflydelse, da de anvendte doser paa nær en enkelt enten har helbredt alle dyr eller ingen af dem. Den logaritmiske reaktionskurve approksimeres godt af en ret linie med hældningen 0,061, og middelfejlen er 0,079. Med 5 dyr bliver fejlprocenterne $\div 14$ og $+ 16$. I beregningerne er udeladt et enkelt dyr, hvis afvigelse fra linien er $7 \times$ middelfejlen. Der kan muligvis ogsaa gives biologiske grunde for udeladelsen.

3. *Egne forsøg.*

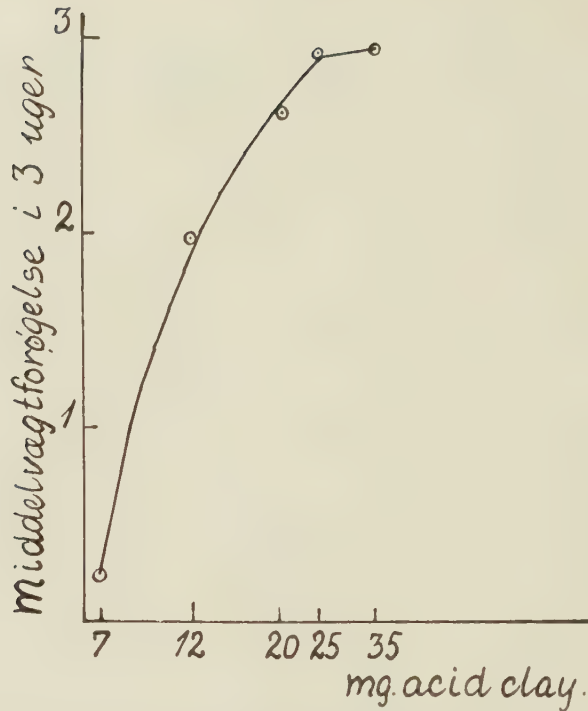
I disse forsøg bestemmes, som vi tidligere har set, hver uge indtil 10 uger efter forperiodens afslutning vægten af en række dyr, der er sat paa en standarddiæt samt en kendt daglig dosis Br- eller B₁₂-vitamin. Forsøgsdyrene er hanrotter, der alle nedstammer fra et enkelt par. Forsøgene strækker sig over 1 aar, men vægtkurverne forløber meget ensartet til de forskellige tider, saa der begaas ikke nogen større fejl ved at behandle alle forsøg under eet.

Da hvert af forsøgene varer 10 uger, er de velegnede til at afgøre, paa hvilket tidspunkt der bestaar den simplest mulige relation mellem vægtforøgelse og vitamindosis. I efterfølgende fig. er middelvægtforøgelse-log dosis-kurven indtegnet for første, anden,, tiende uge. Ugerne regnes fra forperiodens afslutning, og naar den ikke falder paa en onsdag (vejedag), er der interpoleret lineært til de hele uger; den her ved begaaede fejl er uden betydning, da vægtkurverne forløber meget jævnt paa den strækning, der har interesse.

For B₁-vitaminets vedkommende ser man, at kurven for doserne $\geq 0,005$ g standard forløber praktisk talt retlinet fra femte til syvende uge; efter den tid bøjer den af for den største

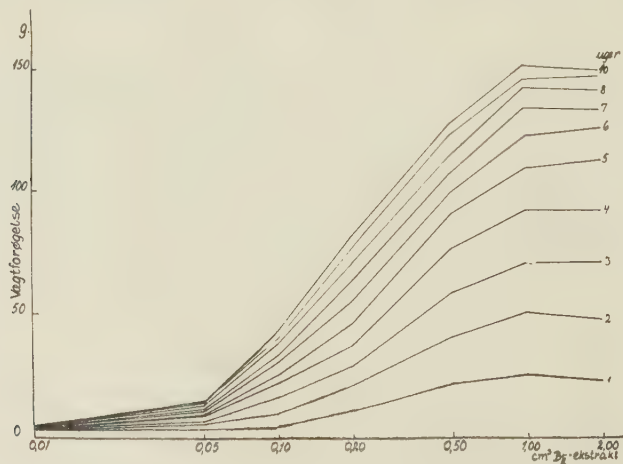


dosis (0,04 g), og før den tid ligger allerede næststørste dosis (0,03 g) for lavt. For vore B₁-vitaminforsøg er 5 uger derfor et *opportunt tidspunkt*. Denne iagttagelse er i overensstemmelse med Birch og Harris' forsøg, hvor 3-ugers kurven forløber krummet fra 0,007 g til 0,025 g acid clay og derefter bøjer brat af parallelt med dosisaksen.



Ogsaa Coward og medarbejderes forsøg viser formentlig dette fænomen; men det er vi paa grund af manglende data ude af stand til endeligt at afgøre.

For B₁₂-vitaminets vedkommende giver tegningen et stærkt indtryk af, at kurven i virkeligheden er S-formet. Et lineært forløb har den i det højeste fra 0,10 cm³—1,00 cm³ B₁₂-vitamin-ekstrakt, og det endda kun i syvende og ottende uge. I vore be-



regninger er syvende uge lagt til grund; men det bør maaske bemærkes, at kurven allerede fra femte uge har et baade jævnt og ret stejlt forløb; kunde man begrunde en mening om, af hvilken type S-kurverne er, synes det derfor ikke udelukket, at man allerede fra femte uge kunde faa resultater, der er ligesaa nøjagtige og ligesaa lette at fortolke som fra syvende uge.

I indledningen til dette kapitel nævnes, at der kan være anledning til at bestemme ligningen for 2 forskellige rette linier som repræsentanter for relationen mellem vitamindosis og vægtforøgelse. Disse ligninger bestemt ved de mindste kvadraters metode er anført nedenfor for de 2 vitaminer. y betegner vægtforøgelsen i henholdsvis 5 og 7 uger, x vitamindosen med henholdsvis 0,01 g acid clay og 0,02 cm³ af vort B_{II}-vitaminekstrakt som enhed.

$$B_I: \begin{cases} y = 45,5 + 113,3 \log x \\ \log x = 0,128 + 0,0085 (y \div 60) \end{cases}$$

$$B_{II}: \begin{cases} y = 64,8 + 95,6 \log x \\ \log x = 0,054 + 0,0101 (y \div 70). \end{cases}$$

De formelt beregnede middelfejl paa en enkelt iagttagelse er:

$$B_I: \begin{cases} \sigma_y = 8,0 \\ \sigma_{\log x} = 0,063 \end{cases} \quad B_{II}: \begin{cases} \sigma_y = 7,7 \\ \sigma_{\log x} = 0,083 \end{cases}$$

Nu beregnes f. eks. for hver enkelt B_I-vitaminvægtforøgelse den ved ligningen definerede teoretiske værdi af $\log x$, og man tæller efter, hvor mange af afvigelserne fra de faktiske værdier, der ligger mellem $\div 2,5$ og $\div 2,0 \times \sigma_{\log x}$, mellem $\div 2,0$ og $\div 1,5 \times \sigma_{\log x}$ etc., og disse antal A_o sidestilles med de antal A_c , der svarer til den normale fordelingslov. Resultatet af denne beregning er for baade B_I og B_{II}:

Afvigelser divideret med $\sigma_{\log x}$ i inter- vallerne	B _I		B _{II}	
	A_o	A_c	A_o	A_c
$\div 2,5 - \div 2,0$	3	0,7	0	0,6
$\div 2,0 - \div 1,5$	0	1,8	0	1,6
$\div 1,5 - \div 1,0$	2	3,6	5	3,2
$\div 1,0 - \div 0,5$	9	6,0	9	5,2
$\div 0,5 - 0,0$	9	7,7	3	6,7
0,0 — 0,5	4	7,7	2	6,7
0,5 — 1,0	4	6,0	7	5,2
1,0 — 1,5	7	3,6	7	3,2
1,5 — 2,0	1	1,8	1	1,6
2,0 — 2,5	1	0,7	1	0,6

Begge fordelinger er ejendommelige. For B_{II} skulde der være ca. 13,4 mellem $+ 0,5$ og $\div 0,5 \times$ middelfejlen, men der er kun 5; og mellem $0,5$ og $1,5 \times$ middelfejlen skulde der kun være ca. 8,4, men der er 14, og det samme gælder intervallet mellem $\div 0,5$ og $\div 1,5 \times$ middelfejlen. Fordelingen har 2 maksima, og dens opstaaen forklares simplest ud fra den antagelse, at forsøgsdyrene kan adskilles i 2 biologisk velafgrænsede grupper, hvortil der svarer 2 forskellige, men parallelle linier i afstand ca. $\pm 1,0 \times$ middelfejlen fra den fundne linie. Da fordelingen har et minimum omkring $0,0$, kan de 2 grupperes middelfejl ikke overstige $\frac{1}{2} \times$ den beregnede middelfejl $\sigma = 0,083$. Hvad enten man nu lægger dyr fra den ene eller den anden gruppe til grund for et forsøg, vil $\log x$ altsaa kun undtagelsesvis afvige mere end $\pm 3 \times \frac{\sigma}{2}$ fra den af ligningen beregnede værdi $\pm 1 \times \sigma$, ialt højst $2\frac{1}{2} \sigma$ fra den beregnede værdi. Med $\sigma = 0,08$ og fejlgrænserne $\pm 3 \sigma$ er man altsaa paa den sikre side.

Ogsaa i B_I -vitaminets fordeling er der antydnet 2 maksima, men sagen kompliceres her noget af, at der faktisk er 3 afvigelser, som efter den normale fordelingslov skulde være ret sjældne. Det er derfor sikrest at regne med en noget større middelfejl end den beregnede f. eks. med $0,08$; herved bliver der kun een afvigelse $\geq 2,0 \times$ middelfejlen.

Idet vi altsaa regner med samme middelfejl $0,08$ for begge vitaminer, kan den unøjagtighed ($\pm 3 \times$ middelfejlen paa $\log x$ og de tilsvarende grænser for x), hvormed en vitamindosis er bestemt ved et forsøg med n dyr, aflæses af nedenstaaende tabel.

TABEL 10.

n.	Variationsgrænser for	
	$\log x$	x
1	0,240	$\div 42 \% - + 74 \%$
2	0,170	$\div 32 \% - + 48 \%$
3	0,138	$\div 27 \% - + 37 \%$
4	0,120	$\div 24 \% - + 32 \%$
5	0,107	$\div 22 \% - + 28 \%$
6	0,098	$\div 20 \% - + 25 \%$
7	0,091	$\div 19 \% - + 23 \%$
8	0,085	$\div 18 \% - + 22 \%$
9	0,080	$\div 17 \% - + 20 \%$

n.	Variationsgrænser for	
	log x	x
10	0,076	÷ 16 % — + 19 %
11	0,073	÷ 15 % — + 18 %
12	0,070	÷ 15 % — + 17 %
13	0,067	÷ 14 % — + 17 %
14	0,064	÷ 14 % — + 16 %
15	0,062	÷ 13 % — + 15 %

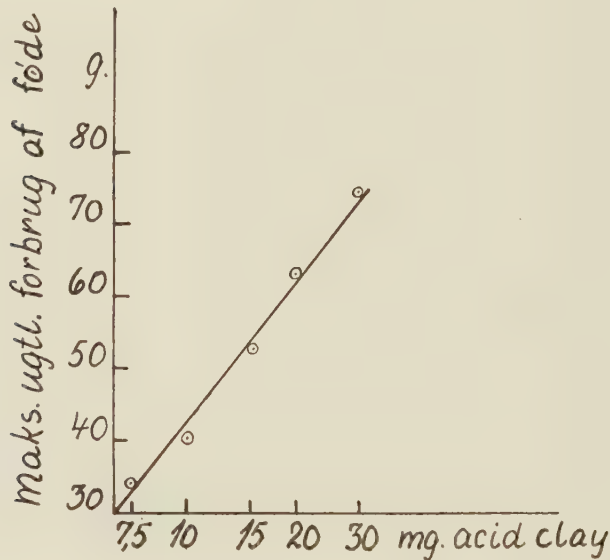
Vi har søgt en forklaring paa de 2 ejendommelige fordelinger ved inddeling af materialet efter forskellige kendemærker: tidspunktet for forsøget, dyrets vægt før og efter forperioden og forperiodens varighed; men det giver intet klart resultat. Det er imidlertid muligt, at forklaringen skal søges i, at vurderingen principielt er lidt forkert anlagt. Det er jo lidt urimeligt at tage sit udgangspunkt i vægtforøgelsen, da den samme vægtforøgelse er af højst forskellig betydning for smaa og store dyr. Der tilbyder sig da forskellige vurderingsprinciper, som dog til syvende og sidst munder ud i, at vægtkurverne bør gøres til genstand for en grundig analyse. En saadan falder imidlertid uden for dette arbejdes rammer.

Vort materiale antyder forøvrigt muligheden af endnu en metode, som i praksis er meget besværlig, men som maaske kan have nogen teoretisk interesse. Ud fra den betragtning, at utilstrækkelige mængder af B-vitamin fremkalder appetitmangel, saa at dyret spiser mindre og derigennem faar en lavere forløbende vægtkurve, er der søgt en relation mellem vitamin-doserne og den indtagne føde. De hertil paakrævede iagttagelser er kun anstillet i begrænset udvalg af forsøgene — i de fleste ikke ud over 4—5 uger. Da der kun foreligger 2 doser af B₁₂-vitamin, maa undersøgelsen begrænses til B₁₂-vitaminet, for hvilket den daglige fødemængde er iagttaget for doserne 0,0075 g, 0,01 g, 0,015 g, 0,02 g og 0,03 g aktiveret acid clay.

TABEL 11.

0,0075 g.		0,01 g.		0,015 g.		0,02 g.		0,03 g.	
Nr.	F.	Nr.	F.	Nr.	F.	Nr.	F.	Nr.	F.
1046	$\geq 31,5$	870	39,0	881	$\geq 56,5$	887	$\geq 60,5$	984	66,5
1005	$\geq 32,0$	868	$\geq 37,5$	880	$\geq 51,5$	874	$\geq 69,0$	985	79,0
1006	35,0	867	$\geq 45,0$	878	$\geq 53,0$	873	$\geq 64,0$	986	74,5
1007	32,5	866	$\geq 42,0$	876	53,0	872	$\geq 68,0$	987	72,5
1008	39,0	864	$\geq 40,5$	877	50,5			988	78,5
Middeltal $\geq 34,0$		$\geq 40,6$		$\geq 52,9$		$\geq 65,3$		74,2	

Maksimalt ugentligt fødeforbrug.



Resultatet er, at der ikke bestaar nogen simpel relation mellem vitaminmængden og det daglige eller ugentlige forbrug paa et bestemt tidspunkt. Men derimod bestaar der formentlig en meget nær lineær relation mellem det maksimale ugentlige forbrug og logaritmen til vitaminmængden.

Angivelsen maa tages med noget forbehold, da en del iagttagelser ikke har været fortsat tilstrækkelig længe til, at dette maksimum har kunnet konstateres. Men i adskillige forsøg har dyrets appetit vist et meget karakteristisk forløb: Den vokser ret jævnt fra forsøgets egentlige begyndelse til et maksimum og

gaar ret jævnt tilbage, begge dele ofte under en del svingninger. Men tidspunktet, hvor dette maksimum optræder, kan være forskelligt for de forskellige dyr, selv om de er af samme kuld og faar samme vitaminmængde. (Nr. 984 og 985 (tavle XXXIV) af kuld nr. 2014 har deres maksima omkring henholdsvis $6\frac{1}{2}$ og $8\frac{1}{2}$ uger efter forperiodens afslutning).

4. Sammenligning mellem metoderne.

I nedenstaaende tabel er middelfejlene paa vitamindosernes logaritmer samt variationsgrænserne for selve doserne under anvendelse af 5 dyr stillet sammen for de i det foregaaende omtalte metoder undtagen for kostmaalingsmetoden.

TABEL 12.

Vitamin	Fors.dyr	Metode	$\sigma_{\log x}$	Variationsgrænser for 5 dyr
B _I	Duer	Helbredsvæghed (Coward et al.)	0,37	$\div 68\%$ — $+215\%$
—	—	Helbredelsesprocent —	ca. 0,35	ca. $\div 65\%$ — $+200\%$
—	Rotter	Bradycardi (Birch og Harris)	0,11	$\div 29\%$ — $+41\%$
—	—	Kramper — —	0,08	$\div 22\%$ — $+29\%$
—	—	Vægtforøgelse i 3 uger (Coward et al.)	?	?
—	—	Vægtforøgelse i 3 uger (Birch og Harris)	mellem	$\div 9\%$ — $+10\%$ og $\div 24\%$ — $+32\%$
—	—	Vægtforøgelse i 5 uger (Egne forsøg.)	0,08	$\div 22\%$ — $+29\%$
B _{II}	—	Vægtforøgelse i 7 uger (Egne forsøg.)	0,08	$\div 22\%$ — $+29\%$

Det er iøjnefaldende, at duemetoden er langt usikrere end de andre; man skal bruge 20 duer for at faa samme nøjagtighed som ved 1 rottes vægtforøgelse og analogt svarer til 5 rotter 100 duer.

For at opnaa en given nøjagtighed skal man ved bradycardi-metoden bruge ca. dobbelt saa mange dyr som ved de 2 andre metoder.

Det er bemærkelsesværdigt, at krampemetoden, saa vidt materialet har tilladt at bedømme den, synes af samme nøjagtighed som 5 ugers vægtforøgelsesmetoden. Da bedømmelsen er hypotetisk — det forudsættes, at de logaritmiske reaktionskurver for forskellige stoffer er parallelle — vil en række forsøg med flere

doser af samme præparat være ønskelige til nærmere belysning af spørgsmaalet.

De omraader, hvori de forskellige metoder er anvendelige og har de anførte fejlgrænser, er angivet i den følgende tabel.

TABEL 13.

Vitamin	Forsøgsdyr	Metode	Dokumenteret anvendelsesomraade			
B _I	Duer	Helbredelsesvarighed (Coward et al.)	1 — 12	internat.	enheder.	
—	—	Helbredelsesprocent — - -	1 — 12	—	—	
—	Rotter	Bradycardi (Birch og Harris)	1,5 — 3,2	—	—	
—	—	Kramper — —	2 — 4	—	—	
—	—	Vægtforøgelse i 3 uger (Birch og Harris)	0,7 — 2,5	—	—	
—	—	— i 5 uger (Egne forsøg)	0,5 — 4,0	—	—	
B _{II}	—	— i 7 uger (Egne forsøg)	0,25 — 5,0	af vore B _{II}	—	

Duerne har fortrinsvis været anvendt til ret store doser.

Af de forskellige rottemetoder til maaling af B_I giver vægtforøgelsen i 5 uger det største anvendelsesomraade og tillige, som foran vist, den mindste middelfejl. Baade bradycardi- og krampemetoden lider af den mangel, at reaktionen ikke indtræder for doser paa 1 international enhed og derunder.

V. Kapitel.

FORSØG OVER VISSE PRÆPARATIONERS OMTRENT-LIGE B_I- OG B_{II}-VITAMININDHOLD OG DISKUSSION AF DISSES ANVENDELIGHED VED KVANTITATIVE B_I- OG B_{II}-VITAMINBESTEMMELSER.

1. *Kinnersley og Peters antineuritiske ekstrakt.*

Vi har tidligere vist, at dette ekstrakt ikke indeholder paa-viselige spor af B_{II}-vitamin, naar det bliver givet i doser paa 10 draaber om dagen, hvilket er 10 gange sufficient mængde. At ekstraktet er en god B_I-vitaminkilde uden B_{II}-vitamintilblanding er saaledes givet. Dets tørstofindhold er undersøgt og bestemt til 15,1 %. Dets indhold af uorganisk stof ligger ved 2,33 % og kvælstofindholdet er 11,95 % af tørsubstansen.

Af tidligere omtalte tabel 3, der viser vægtforøgelsen af dyr, der samtidig faar sufficient mængde B_{II}-ekstrakt (1 cm³) daglig og 1 draabe Peters ekstrakt daglig, ses, at den 5 ugers vægtforøgelse herved gennemsnitlig pr. rotte beløber sig til 107,8 g. Benyttes nu vor ligning, har vi

$$\log x = 0,128 + 0,0085 (107,8 \div 60) = 0,11.$$

$$\text{Og } x = 3,422 (2,675-4,409).$$

Da 1 cm³ Peters ekstrakt er ca. 35 draaber, findes i 1 cm³ altsaa ca. 120 internationale B_I-vitaminenheder.

Vi skal senere i kapitel VI se, at overgær, som er anvendt til fremstilling af Peters ekstrakt, indeholder ca. 12,1 B_I-vitaminenhed pr. g tørstof. Til fremstilling af 60 cm³ Peters ekstrakt (ialt ca. 7200 internationale B_I-enheder) medgaar 6360 g pressegær med ca. 25 % tørstofindhold, d. v. s. ca. 1600 g tørgær, der ialt indeholder ca. 19300 internationale B_I-enheder. Omtrent $\frac{2}{3}$ af B_I-vitaminet gaar altsaa tabt ved fremstillingen.

Af tavle L ser man, hvordan kurverne for faldende dosering af Peters ekstrakt fordeler sig. Ekstraktet gives fortyndet med vand, svarende til doserne $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{8}$ og $\frac{1}{16}$ draabe ufortyndet Peters ekstrakt.

Forsøger man at anvende vægtkurven for dyr, nr. 713, som har faaet $\frac{1}{2}$ draabe Peters ekstrakt daglig, til udregning af dettes B_I-vitaminindhold, faar man:

$$\log x = 0,128 + 0,0085 (69 \div 60) \pm 0,240$$

$$x = 1,602 (0,9215-2,783).$$

Omregnet til 1 draabe Peters ekstrakt vil det altsaa sige 3,2 (1,8—5,6) internationale enheder, hvilket ligger ganske nær den tidligere ved hjælp af 5 dyr fundne B_I-vitaminværdi af ekstraktet.

2. *International standard acid clay preparation.*

Paa tavle LI ses vægtkurverne for 2 dyr nr. 711 og 712, der har faaet tillæg af den internationale B_I-vitaminstandard i doser paa 50 gange den internationale B_I-vitaminenhed for at undersøge standardens eventuelle indhold af B_{II}-vitamin. Begge dyrene tager lidt paa i vægt, men dør henholdsvis 9 og 6 uger efter forperiodens ophør. Ved sektionen paavises hos begge blege, grøngule lever og nyrer. Kun dyr nr. 711, der har levet over 7 uger, kan anvendes til skønsmæssig kvantitativ bestemmelse. Da den 7 ugers vægtforøgelse er 17 g, har man

$$\log x = 0,054 + 0,0101 (17 \div 70) \pm 0,240$$

$$x = 0,3303 (0,1198-0,5737).$$

1 g acid clay preparation indeholder altsaa ca. 0,7 af vore B_{II}-vitaminenheder, hvilket paa den mængde, som den internationale B_I-vitaminenhed repræsenterer, kun bliver ca. 0,007 B_{II}-enhed; dette er saa lidt, at det ikke kan bringe nogen som helst forstyrrelse, hvis man ønsker at anvende standarden som B_I-vitaminkilde ved kvantitative B_{II}-vitaminbestemmelser.

3. *Aktiveret stivelse.*

Vi har i andet kapitel set, at aktiveret stivelse tilberedt som tidligere beskrevet, der erstatter fra 5—30 % af stivelsen i vor grundkost, ikke indeholder tilstrækkelig mængde B_I-vitamin til at kunne anvendes ved B_{II}-vitaminbestemmelser.

I det følgende skal vi undersøge, dels om aktiveret stivelse indeholder B_{II}-vitamin, dels forsøge at bestemme B_I-vitaminindholdet. Ved at betragte tavle LII ser man, at vort aktiverede stivelse, naar denne fuldstændigt erstatter stivelsen i vor grundkost, intet paaviseligt B_{II}-vitamin indeholder, da denne kost givet sammen med Peters B_I-ekstrakt i en mængde af 1 draabe daglig ikke giver vægtforøgelse hos dyrene (nr. 976 og 1020).

Aktiveret stivelse, der erstatter 75 % af stivelsen i vor grundkost, giver god, kraftig vækst, naar den gives som B_I-vitaminkilde til B_{II}-vitaminholdig kost (dyr nr. 975). Den 5 ugers vægtforøgelse ligger ved 135 g, hvilket er mere, end vi kan beregne, hvis vi ønsker at anvende vor ligning. Vi har derfor forsøgt en mindre dosis af aktiveret stivelse, nemlig 40 %. Resultatet af dette ses ligeledes paa tavle LII, idet dyrene nr. 974, 1032, 1035, 1056 og 1057 har været anvendt hertil. Kun et af disse dyr, nr. 974, har undgaaet at faa diarrhoe; alle de andre viser betydelig uregelmæssig vækst paa grund af diarrhoen; men selv hos nr. 974 viser vægtkurven efter 7 ugers forløb et fald af 4 ugers varighed, hvorefter en ny stigning indtræder. Aarsagen til dette fald og den fornyede stigning er vanskelig at udrede; nogen forandring i kosten (inklusive den aktiverede stivelse) er ikke foretaget hverken paa tidspunktet for vægttab eller vægtstigning.

Vore her foretagne forsøg med aktiveret stivelse opfordrer saaledes ikke til anvendelse af dette som B_I-vitaminkilde ved B_{II}-vitaminundersøgelser, trods utvivlsomt B_I-vitaminindhold og mangel paa B_{II}-vitamin.

4. *B_{II}-vitaminekstrakt. (Spritgærekstrakt autoklaveret 5 timer ved 11½ atmosfæres overtryk).*

At dette ekstrakt selv i doser paa indtil 6 cm³ daglig ikke indeholder paaviselige mængder B_I-vitamin er tidligere vist i andet kapitel. Den daglige sufficente dosis for unge voksende rotter er bestemt til 1 cm³ daglig.

Ekstraktet indeholder 38,6 % tørstof. Dets indhold af uorganisk stof ligger ved 5,23 % og kvælstofindholdet i tørsubstanten er 5,62 %.

Paa grund af dets holdbarhed har vi som omtalt valgt det

som vor B₁₂-vitaminstandard og anvendt 0,2 cm³ daglig dosis af dette som enhed, idet denne dosis, ligesom den internationale enhed for B₁₂-vitaminets vedkommende, er den af de undersøgte doser, der ligger nærmest ved den effektive, kurative rottedosis, der tidligere anvendtes ved B-vitaminkompleksbestemmelser paa universitetets hygiejniske institut.

Vi skal nu i det følgende undersøge, hvor meget B₁₂-vitamin, der tabes ved autoklaving af gærekstrakt. Vi erindrer, at spritgærekstraktet bliver inddampet til et saadant rumfang, at 1 cm³ af dette svarer til 2 g torgær. Paa tavle LIII ser man af vægtkurverne for dyr nr. 935 og 969, der som B₁₂-vitaminkilde daglig har faaet 0,25 cm³ uautoklaveret spritgærekstrakt, at den gennemsnitlige vægtforøgelse i 5 uger for disse er 68,5 g. Heraf udregnes ved

$$\log x = 0,128 + 0,0085 (68,5 \div 60) \pm 0,170,$$

at B₁₂-vitaminindholdet heri er 3,1 (2,2—4,7) internationale B₁₂-vitaminenheder paa 0,5 cm³, der svarer til 1 g torgær. 1 g spritgær (torgær) indeholder, som vi senere skal se, 3,6 (2,8—4,6) internationale enheder pr. g; vi ser altsaa, at man ved ekstraktion af gæren og inddampning af denne ved kogning næsten intet B₁₂-vitamin taber.

Prøver vi dernæst ekstraktets B₁₂-vitaminindhold før autoklavingen, ser vi ligeledes paa tavle LIII af vægtkurverne for dyr nr. 936 og 941, at den gennemsnitlige vægtforøgelse i 7 uger for disse dyr, der har faaet 0,1 cm³ af ekstraktet daglig som B₁₂-vitaminkilde som tillæg til kost, der kun mangler B₁₂-vitamin, er 53,5 g. Heraf udregnes ved $\log x = 0,054 + 0,0101 (53,5 \div 70) \pm 0,170$, at B₁₂-vitaminindholdet heri er 3,9 (2,6—5,8) af vore B₁₂-vitaminenheder paa 0,5 cm³, der svarer til 1 g torgær. 1 g spritgær (torgær) indeholder, som vi senere skal se, 6,6 (5,1—8,5) af vore B₁₂-enheder pr. g; vi ser altsaa, at man ved ekstraktion af gæren og inddampning af denne ved kogning taber noget under halvdelen af B₁₂-vitaminet. Ved en 5 timers autoklaving ved 1½ atmosfæres overtryk (ca. 120° C paa vor autoklave) tabes yderligere en trediedel; dette udregnes af vor tidligere tabel 3, hvor 5 dyr gives 0,5 cm³ autoklaveret B₁₂-vitaminekstrakt daglig (svarende til 1 g torgær). Den gennemsnitlige 7 ugers vægtforøgelse her er 105,8 g, hvorved vi faar

$$\log x = 0,054 + 0,0101 (105,8 \div 70) \pm 0,11$$

$x = 2,6$ (2,0—3,4) af vore B₁₂-vitaminenheder.

Endelig har vi prøvet at autoklavere vort spritgærekstrakt 24 timer ved 1½ atmosfære og finder endnu rigeligt B₁₂-vitaminindhold i dette. (Hvor meget kan ikke siges, da det kun er prøvet paa et dyr, der først har været anvendt i 6 uger i andet øjemed; man har derefter frataget det B₁₂-vitamin og derved bragt det til at falde i vægt; paa dette tidspunkt gives det i 24 timer autoklaverede spritgærekstrakt i doser paa 2 cm³ daglig, hvilket fremkalder stærk vækst i de 4 uger, hvori ekstraktet doseres. (Tavle LIII dyr nr. 734, der kun viser den sidste del af vægtekurven, der har interesse for os i denne sammenhæng).

5. *Forskellige proteinpræparationer.*

Det er tidligere vist, at de i andet kapitel beskrevne proteinpræparationer intet B₁₂-vitamin indeholder. Ser vi paa tavle LIV, lægger man imidlertid mærke til, at æggehvidepræparationerne indeholder en vis mængde B₁₂-vitamin. Dyr nr. 758 og 757 har faaet henholdsvis 5 cm³ og 10 cm³ frisk æggehvide som dagligt tillæg til en B₁₂-vitaminfri, men iøvrigt sufficient kost. Den 7 ugers vægtforøgelse er henholdsvis 43 og 47 g. Heraf udregnes frisk æggehvides B₁₂-indhold til henholdsvis 1,0 (0,6—1,8) og 0,6 (0,3—1,0) af vore B₁₂-enheder pr. g tørstof, idet frisk æggehvide indeholder 11,9 % tørstof.

Fortsættes doseringen imidlertid af æggehviden, ser man, at vægten omkring 7—10 uge bliver stationær eller endog let faldende den følgende tid. Samtidig indtræder hos det dyr (nr. 757), der faar 10 cm³ æggehvide om dagen, en pellagralignende lidelse med skorper omkring øjnene, paa ørerne, ringet hale og haaraffald, samt begyndende gangræn af enkelte tæer. Dette, at det dyr, der faar mest æggehvide og altsaa mest B₁₂-vitamin, angribes kraftigst, taler for, at symptomerne skyldes toxicitet af æggehviden.

Endvidere er en opløsning af det tidligere omtalte tørrede kinesiske æggehvidepræparat undersøgt for B₁₂-vitaminindhold. Det gives som en 10 % opløsning i vand i doser paa henholdsvis 3,5 og 7 cm³ (svarende til 5 og 10 cm³ frisk æggehvide) til dyr nr. 759 og 763 (tavle LIV). Den 7 ugers vægtforøgelse er hen-

holdsvis 27 og 74 g. Heraf udregnes tørret kinesisk æggehvides B₁₂-vitaminindhold til henholdsvis 1,1 (0,6—1,8) og 2,0 (1,2—3,5) af vore B₁₂-enheder pr. g tørstof, idet dette præparat indeholder 86,6 % tørstof.

Kun hos det første af disse dyr bliver vægten efter 8 uger stationær; hos ingen af dyrene iagttages dermatitis.

Endelig er B₁₂-vitaminindholdet bestemt i en 10 % opløsning af tørret kinesisk æggehvide, hvor alt proteinet er udfældet ved kogning med Sørensens væske, som beskrevet tidligere. Dyr nr. 756 og 755 (tavle LIV) faar henholdsvis 1 cm³ og 5 cm³ af denne opløsning daglig (svarende til henholdsvis 10 og 50 cm³ frisk æggehvide daglig beregnet ud fra dennes tørstofindhold). 7 ugers vægtforøgelse er henholdsvis 39 g og 68 g, saaledes at 1 cm³ af præparationen findes at indeholde henholdsvis 0,6 (0,3—1,0) og 0,2 (0,1—0,4) af vore B₁₂-vitaminenheder. Begge dyrenes vægte bliver stationære ved 9—12 uge, hvorefter der hurtigt indtræder dermatitiske tilfælde hos begge dyr, der dog kureres let ved tillæg af blot ½ cm³ af vort B₁₂-ekstrakt daglig, selv om dyrene vedblivende faar »æggehvidepræparationen«. Da denne ikke indeholder æggehvide, kan det altsaa ikke være selve æggehviden, der virker toksisk, men maaske en toksisk faktor fra æggehviden, der er gaaet over i den vandige opløsning, hvor der ligeledes findes noget B₁₂-vitamin.

Men man kan ogsaa tænke sig, at disse dermatitissymptomer skyldes mangel paa Y-faktor, idet de kureres ved tillæg af B₁₂-ekstrakt, som tillige indeholder Y-faktor.

Det er dog vanskeligt paa basis af de nævnte forsøg at komme helt til klarhed over disse forhold, som synes ret komplicerede. I det afsluttende kapitel vil en del literatur angaaende disse problemer blive gennemgaaet.

VI. Kapitel.

FORSKELLIGE GÆRSORTERS INDHOLD AF B-VITAMINER OG DETTE INDHOLDS RELATION TIL DYRKINGSMEDIET.

1. *Indledning.*

Endnu inden navnet B-vitamin var kendt og knyttet til Eijkmans antineuritiske princip, vidste man, at gær indeholder denne ernæringsfaktor i stor mængde, og overalt i B-vitamin-litteraturen finder man som oftest gær betegnet som en rig B-vitaminkilde. Først i de senere aar, men dog langt fra konstant, er man begyndt at angive, hvad slags gær der in casu er tale om, samt under hvilke forhold denne er dyrket; vi skal i det følgende se, at dette kan have betydning for gærens indhold af B-vitamin. Det er naturligt, at man interesserer sig for, hvorfra gæren skaffer sig sit indhold af B-vitamin, da som tidligere nævnt dette kan antages at have saavel betydelig teoretisk som nogen praktisk interesse; men trods den meget store videnskabelige produktion, der er udført i dette øjemed, kan problemet endnu ikke siges med sikkerhed at være løst.

Naar vi i det følgende skal komme ind paa ovennævnte litteratur, vil det samtidigt være nødvendigt at gennemgaa ret talrige arbejder, der beskæftiger sig med et gærvækststimulerende princip, det saakaldte »bios«, idet man i en periode har ment, at dette og B-vitamin var nær beslægtede eller endog identiske. Derimod skal her ikke omtales de af Nielsen og Hartelius her i landet for nylig beskrevne vækststoffer A og B, da disses forhold til B-vitamin ikke kendes.

De senere aars uddifferentiering af B-vitaminkomplekset har nødvendiggjort, at B-vitaminernes genese paa ny er optaget til undersøgelse, men kun ret faa moderne arbejder herover eki-

sterer. Det er imidlertid forstaaeligt, hvis arbejdet med disse emner skræmmer; thi en vis gæringsbakteriologisk teknik forbundet med erfaring i arbejde med B-vitaminer maa kræves for at undgaa at forsynde sig mod talrige elementære krav, der er nødvendige for opnaaelsen af brugelige resultater, saa meget desto mere, som forsøg hermed er overordentlig tidsrøvende og kræver aar for at kunne udføres.

Da det, som vist i det foregaaende, er lykkedes os at udforme en metode til kvantitativ B_I- og B_{II}-vitaminbestemmelse, som arbejder tilfredsstillende, er det vor agt i det følgende at forsøge ved hjælp af denne metode at bestemme gærs evne til at danne disse vitaminer ved dyrkning i B-vitaminfri »syntetiske« substrater, idet tidligere undersøgelser ikke med tilstrækkelig klarhed viser, om gær formaar at syntetisere eller blot adsorbere disse vitaminer fra substratet. Principet i vore forsøg er at dyrke gær dels i B-vitaminfrit substrat, dels i ølurt og derefter undersøge dels gærens indhold af B_I- og B_{II}-vitamin, dels substraternes indhold heraf før og efter dyrkningen. Gennem disse bestemmelser er der en mulighed for at faa oplysning om, hvorfra gærens indhold af B-vitaminer stammer.

2. Historisk gennemgang.

A. »Bios«, dets betydning for vækst af gærceller, dets syntetisering af dette samt dets relation til B-vitamin.

Pasteur var en af de første, som har dyrket gær i næringsopløsninger bestaaende udelukkende af uorganiske bestanddele og sukker, idet han i 1860 viste, at gærceller i et substrat, bestaaende af 10 g sakkarose, 100 cm³ vand, 0,1 g ammoniumtartrat og 1 g gæraske, formaaede at forgære og formere sig, idet de omdannede uorganisk kvælstof til organisk. Liebig imødegik 1871 Pasteurs resultater og benægtede, at gær kunde vokse og forgære i en mineralsaltsukkeropløsning, idet han ikke formaaede at gøre Pasteurs forsøg efter. 1874 bekræftede Pasteur imidlertid sine egne resultater, idet man dog maa bemærke, at Pasteur i modsætning til Liebig anvendte store udsaaninger.

Wildiers viste i 1901, at gærceller, som voksede i og kraftigt forgærede steril urt enten slet ikke voksede eller voksede uhyre

langsomt, naar de i meget smaa mængder udsaaedes i et syntetisk medium, bestaende af 20 g sakkarose, 50 cg MgSO_4 , 50 cg KCl , 50 cg NH_4Cl , 50 cg Na_2HPO_4 og 10 cg CaCO_3 opløst i 200 g vand. Kolber med 125 cm^3 substrat vejedes hver dag, og eventuel vækst bestemtes ved det vægttab, der opstod ved kultsyreudvikling. Efter 5 dages forløb havde kolber tilsaaet med 2 draaber af en gærkultur ikke tabt i vægt, medens 5 draabers tilsaaning gav ca. 5 g's vægttab. Wildiers demonstrerede, at virkningen af store podninger ikke skyldtes et forøget antal levende celler, men derimod tilførsel af et kemisk stof, som findes i filtratet fra kogte gærceller. Dette stof kaldte han »bios«; han fandt, det har følgende egenskaber: opløseligt i vand og i fortyndet alkohol (indtil 80 %), uopløseligt i absolut alkohol og æter; det findes ikke i gærask (altsaa ikke uorganisk), ødelægges ikke af $\frac{1}{2}$ times kogning i 5 % H_2SO_4 , hvorimod 20 % H_2SO_4 og 1 % NaOH destruerer det; det fældes ikke af blyacetat, er dialysabelt og findes ikke i forbindelser som urinstof, asparagin, anilin, tyrosin, nukleinbaser, adenin, guanin, nukleinsyre, kreatin, pepsin- og trypsinfordøjet albumin, derimod forekommer det i Liebig's kødekstrakt, handelspepton og i ølurt. Han angav, at gær nok formaar at vokse i mineralsaltsukkeropløsnin-
ger uden »bios«, men væksten er langsom, og cellerne er syge.

Fernbach (1901) var en af de første, der imødegik Wildiers anskuelser, idet han mente, at grunden til, at Wildiers kun fik vækst ved store udsaaninger, er den, at der i substratet findes toksiske stoffer, som formaar at dræbe faa celler, men ikke mange. Krieger (1901) samt Henry og senere Windisch (1902) var ikke i stand til at bekræfte Wildiers angivelser, idet bl. a. Henry fik god vækst af 5 forskellige slags gær ved videredyrking flere gange af 3 draaber kultur til 500 cm^3 Wildiers substrat.

Amand derimod forsvarede i 1902 og 1904 Wildiers resultater, idet han viste, at gær optager og fjerner »bios« fra substratet, samt at gær dyrket paa biosrigt og biosfattigt substrat er henholdsvis rig og fattig paa »bios«. Kossowicz viste (1903 og 1906), at ved meget smaa podninger finder der ingen multiplikation eller forgæring sted, ved større tilsaaning (> 100 celler) finder der let formering, men ingen forgæring sted, hvorimod der

kommer god vækst og forgæring ved store udsaaninger paa ca. 1.000000 gærceller.

I 1906 fremsatte Pringsheim den idé, at gærceller formaar at vænne sig til at vokse i mineralsaltsukkeropløsninger. Ved større tilsaaning er der derfor større chance for at finde celler, der har evnen til at anvende de uorganiske forbindelser, ligesom der ogsaa ved celledød frigives mere celleføde til de unge celler, end hvis der kun anvendes et ringe antal celler til podning. Ved gentagen omsaaning kan cellerne — selv enkeltceller — vænne sig til at vokse i uorganisk medium. Denne teori kunde ikke bekræftes af Ide, der i 1907 viste, at der ikke fandtes forskel paa cellers evne til at vokse straks eller senere, ligesom han ikke fandt, at »bios« nødvendigvis skal være til stede for at opnaa vækst af gærceller.

Ehrlich angav i 1911, at gær formaar at vokse i mineralsaltsukkeropløsninger med aminosyrer, idet disse desamideres og kun amoniaken bruges.

Naumann foretog i 1920 nogle forsøg, der støtter Pringsheims tilvænnningsteori. Han tilsaaede 10 cm³ syntetisk substrat med 5 gærceller, hvilket ikke gav vækst eller forgæring i 40 dage. Podedes med 50 celler i stedet for 5, kom der vækst i løbet af 3 og forgæring i løbet af 10 dage. Ved at forøge tilsaaningens nedsattes tiden, førend væksten indtraadte, hvilket han mente skyldes opløsning af døde celler. Blot ganske lidt pepton i en koncentration paa 0,0005 % hjælper gæren over tærskelen, og formering finder hurtigt sted. Forfatteren antog, at de levende gærceller optager kvælstofforbindelserne fra de døde og derved formerer sig; dette skyldes derimod ikke »bios«.

Lindner (1920) var derimod ikke af denne mening. Han opstillede paa basis af resultatet af talrige undersøgelser en hel ny teori: jo sparsommere kvælstofforsyning, desto stærkere fedtophobning, men desto langsommere formering. Han fandt nemlig, at fedtophobning i gærceller sker ved dyrkning af disse i mineralsaltsukkeropløsninger ved tilstedeværelse af ilt, idet cellerne i saa fald tilbageholder alkohol og omdanner denne til fedt. Uden ilt dannes intet fedt, selv ved tilstedeværelsen af rigeligt sukker og alkohol. Alkohol kan saaledes under visse betingelser optræde som næring for gærceller, som med hensyn til deres

forbrug heraf kan blive ganske umoderate og ophobe indtil 40—50 % fedt, idet de dog samtidig mister evnen til knopskydning.

Allerede Schaumann (1910) og senere Cooper og Funk (1911) samt Edie, Evans, Moore, Simpson og Webster (1912) havde vist, at gær indeholder store mængder af Eijkmans anti-neuritiske substans, og endnu inden B-vitaminbegrebet kendtes, fandt Kurono i 1915, at et præparat, kaldet oryzanin, tilberedt af risskallers yderste lag tilsat syntetiske substrater eller urt, forøger gærens vækstintensitet i disse medier, selv om dette stof tilsættes i saa ringe mængde som 0,01—0,1 %. Samme aar anvendte Volk som den første gær, der var dyrket i syntetiske opløsninger, til dyrefodringsforsøg.

Den første, der mente at have bevist, at B-vitamin og »bios« er identiske, var Williams, der i 1919 gennem en lang række forsøg fandt, at tillæg til syntetisk substrat af »bios«-holdige produkter overalt viser, at disse er rige paa indhold af B-vitamin, medens mangel paa B-vitamin aldrig giver forøget gærvækst. Disse resultater dannede grundlaget for en kvantitativ metode til B-vitaminbestemmelse baseret paa dyrkning af gærceller i syntetisk substrat; gærmængden vejedes, og denne mængde minus den i kontrolglasset voksede mængde anvendtes til udregning af B-vitaminindholdet i teststoffet.

Bachmann modificerede 1919 denne prøve, idet hun anvendte luftdannelsen som kriterium for vækst. Forgæring og vækst forløber imidlertid ikke altid parallelt, f. eks. kan gærceller forgære, efter at de er ophørt at vokse, som vist af Euler og Petterson (1921) og bekræftet af Philipson (1930). Det er endvidere vist, at paavirkning med røntgen (Wells og Osan 1925) eller phenol (Euler og Sandberg 1925) eller acetone (Hardin 1930) dræber gær, men ikke forhindrer forgæring. Omvendt forhindrer en ringe koncentration af bromeddikesyre (Cayol og Genevois 1931) forgæring, men standser ikke gærvækst.

En del andre forskere har modificeret Williams gær dyrkningsprøve som B-vitaminbestemmelsesmetode, bl. a. Stevenson (1919), Swoboda (1920), Funk og Dubin (1920) samt Euler og Petterson (1921).

Emmett og Stockholm fandt imidlertid i 1920, at Williams

metode ikke er specifik, idet de paaviste, at den gærvækstinducerende faktor ikke synes at være identisk med antineuritisk B-vitamin. Forsøg udført af Souza og Mc Collum samme aar viste, at Williams prøve er kompliceret af saa mange forstyrrende forhold, at disse gør den næsten eller fuldstændig værdiløs.

Ligeledes viste Flemming i 1921, at gærvækstprøven er uanvendelig som specifik kvantitativ B-vitaminmaalemetode, idet ekstrakter behandlet med alkali, altsaa ikke indeholdende B-vitamin, er lige virksomme som gærvækstaktivatorer før og efter denne behandling. En del andre forfattere fastslog ligeledes metodens uegnethed i nævnte øjemed bl. a. Eddy, Heft, Stevenson og Johnson (1921), Lobeck (1922), Funk og Paton (1922) o. a.

Endnu i 1928 har dog Peters og medarbejdere under koncentreringsforsøg med Br-vitamin anvendt en »streptothrix«-prøve som et hurtigt middel til bestemmelse af B₁-vitaminmængden i de forskellige fraktioner.

Mac Donald og Mc Collum dyrkede 3 forskellige gærstammer i mineralsaltsukkeropløsninger, hvor rørsukkeret rensedes ved gentagen udfældning af vandig opløsning med absolut alkohol. 25 cm³ substrat tilsaaedes med en øskenfuld; efter 7 dages vækst i termostat foretoges fornyet omsaaning. Hvis cellerne i en øsken ikke hverken modtog eller afgav »bios«, vilde der i kolbe 2 findes 1/25, i kolbe 3 1/25 af 1/25 = 1/625 og i kolbe 10 1/56672536114400 eller mindre end en 5 trilliontedel af den oprindelige »bios«-mængde. Da gæren stadig vokser, sluttede forff., at enten formaar gær at syntetisere »bios« eller ogsaa at vokse uden dette eller B-vitamin.

Ide kritiserede 1921 Mac Donald og Mc Collums forsøg, idet han angav, at der findes 2 slags gærvækst, den ene meget langsom uden »bios«, den anden hurtig med »bios«. »Bios« forøger forgæringen af rørsukker ca. 30 gange.

Funk og Dubin (1921), Funk og Paton samt Funk og Freedman (1922) viste, at det er muligt ved hjælp af fullerjord, norrit etc. fra B-vitamin at adskille et princip, som virker vækststimulerende paa gær: dette benævnedes »D-vitamin« = »bios«. De angav, at B-vitamin lettere paavirkes af autoklaving og alkali end »D-vitamin«, samt at gær, der er dyrket i en opløsning inde-

holdende »bios«, opbruger dette, men efterlader B-vitamin; denne metode anbefaledes til adskillelse af B-vitamin og »bios«.

Heaton undersøgte ved forgærings- samt ved rotte- og due-forsøg B-vitamin- og »D-vitamin«-indholdet i organer fra rotter, der havde faaet henholdsvis normal og B-vitaminfri kost, og kom til det resultat, at »bios« (»D-vitamin«) og B-vitamin ikke er identiske.

Ved anvendelse af et substrat med asparaginkvælstof som kvælstofkilde samt rensed glukose og rensede salte kunde Robertson og Davis (1923) ikke videredyrke gær ved smaa udsaaninger, men kun naar store podninger foretoges. Heraf sluttedes, at gær ikke formaar at syntetisere sin egen vækstfremkaldende faktor: ved store udsaaninger overføres vækststimulerende faktorer bl. a. stoffer fra døde gærceller.

Willaman og Olsen (1923) demonstrerede gennem forsøg, at rørsukker ikke renses for »bios« ved omkrystallisation med absolut alkohol, som kun fjerner B-vitamin; alkohol af 80 % og derunder fjerner tillige »bios«. Paa grundlag af dette kritiseres arbejder af Mac Donald og Mc Collum samt Fulmer og Nelson, da disse anvendte absolut alkohol til rensning af sukkeret. Forff. prøvede 60 forskellige kemiske forbindelser uden at finde nogen af disse identiske med »bios«.

I et arbejde fra 1923 imødegik Fulmer og Nelson de tidligere omtalte konklusioner af Robertson og Davis undersøgelser. De viste nemlig, at det i 3 forskellige syntetiske substrater er muligt at dyrke gær kontinuerligt i 39 maaneder med omsaaning hver tredie dag, uden at tilsætning af »bios« er paa-krævet. Forff. pointerede, at hvis gær ikke vil vokse i syntetisk medium, kan det skyldes, at dette er uegnet, at temperaturen er forkert valgt, at kulturen er uren, eller at omsaaning sker for tidligt. Robertson og Davis anvendte som termostattertemperatur ved deres dyrkningsforsøg 37,5° C, ved hvilken temperatur gær sædvanligvis har vanskelighed ved at trives.

Fulmer og Nelson gav samtidigt et anskueligt eksempel paa den hyppige omsaanings betydning for ophør af gærs formering: hvis man gaar ud fra et substrat, hvori den undersøgte gærsort formerer sig 30 gange i løbet af 24 timer, og man til 49 cm³ friskt medium hver dag tilsætter 1 cm³ af en kultur, faar man

f. eks. i første kolbe en tælling paa 50 (tælling 1 = 250000 celler pr. cm^3). I første omsaaning findes efter 24 timer tælling 30, i anden omsaaning straks tælling 0,6 og efter 24 timer tælling 18, i tredje omsaaning straks tælling 0,36 og efter 24 timer tælling 10,8 o. s. fr., indtil man ved ottende omsaaning ved tælling straks finder 0,028 og efter 24 timer 0,84; denne vækst formaar næppe at gøre væsken uklar og foranlediger let til at tro, at væsten er standset.

Fra forskellig side, navnlig som tidligere nævnt Willaman og Olsen, kritiseredes visse forfatteres forsøgsresultater, da det hævdedes, at det af disse anvendte rørsukker indeholdt spor af »bios«. Det var derfor af overordentlig interesse, da det lykkedes for Fulmer, Nelson og White (1923) at dyrke gær kontinuerligt i et substrat af fuldstændig syntetisk oprindelse, idet det tidligere anvendte rørsukker erstattedes med et stof: methose, der er et polymerisationsprodukt af formalin, første gang fremstillet af Loew i 1889; dette stof forgæres af ølgær, som vokser godt i medier med methose som sukkerkilde.

I modsætning til mange tidligere undersøgere anvendte Tanner og medarbejdere (1925) et stort antal forskellige gærsorter (ialt 50). Disse dyrkedes i forskellige syntetiske medier, hvoraf Fulmer og Nelsons medium F. hyppigst viste sig mest velegnet, idet det dog pointeredes, at hver slags gær sandsynligvis har sine specielle næringskrav. Manglende vækst kan skyldes anden aarsag end manglende »bios«, og omvendt kan forøget vækst efter tilsætning af formodet »bios«-præparat skyldes andre faktorer end selve »bios«.

Wallace og Tanner (1928—29) undersøgte forskellige hovedpunkter af kapital betydning for gær dyrkningsteknik og kom til følgende resultater: blandingsinfektion spiller stor rolle ved vækstforsøg med gær; de organismer, der vokser hurtigst, indskrænker de andres vækst. Nogle bakterier forhindrer eller hæmmer gærsvampes vækst, medens paa den anden side gærsvampe kan forhindre visse bakterier i at vokse. Tidligere havde bl. a. Peskett (1925) vist, at det er muligt at dyrke enkelte gærceller i syntetisk substrat. Dette lykkedes ligeledes for Wallace og Tanner ved forsøg med 4 forskellige gærsorter paa 6 forskellige mineralsaltsukkerblandinger, og forff. viser, at de for-

skellige gærsorter opfører sig forskelligt i et og samme medium, og samme gærsort vokser forskelligt i forskellige medier. Skal man derfor drage direkte sammenligninger, maa vækstbetingelserne holdes ganske ensartede. Manglende vækst ved enkeltcellekulturer kan skyldes isolering af svagelige eller døde celler, daarligt substrat eller forkert temperatur.

Reader angav i 1927 en saltopløsning med glukose, som viste sig velegnet til dyrkning af forskellige mikroorganismer. De reneste analysekemikalier anvendtes, og glukosen rekrystalliseredes for at befri denne for eventuelle vækststimulerende urenheder. Saltene var ammonium- og magniumsulfat, surt primært og sekundært kaliumfosfat, natriumklorid og kaliumnitrat. Dekstrose anvendtes i 1 % opløsning.

Dette substrat fandt Copping i 1929 velegnet til paavisning af »bios«-effekt overfor 20 forskellige gærsorter. Kolber og andre glasrekvisiter befriedes for organisk stof ved hjælp af varm kromsyreopløsning, og der blev draget omhyggelig omsorg for overholdelsen af sterile kauteler. Det viste sig, at med hensyn til vækstevne fordelte disse 20 gærarter sig i 3 grupper. En gruppe med 5 medlemmer viste god vækst i 24 timer; en gruppe ligeledes med 5 medlemmer gav langsom vækst i løbet af 3 døgn, hvorimod de resterende 10 gærsorter udviste ingen eller kun svag vækst i 14 dage. Ved tilsætning af lidt autoklaveret gær-ekstrakt til substratet viste alle stammer straks kraftig vækst. De 5 gærsorter, der viste god vækst, dannede »bios« i substratet, medens dette ikke var tilfældet med resten. Disse 5 tilhørte alle ikke aktivt forgærende typer, saaledes at der er en mulighed for, at forskellig gærs »bios«-krav og gæringsevne er knyttet til hinanden.

1930 foretog Narayanan en kemisk undersøgelse af »bios«, hvis aktivitet bestemtes ved hjælp af Readers substrat og en ølgærstamme. Denne udsaaedes i en kolbe med 100 cm³ medium, saaledes, at der fandtes ca. 2500 celler pr. cm³ (tælling 0,01). Som kriterium for vækst antoges 100-dobling paa 24 timer (tælling 1) eller synlig vækst paa 48 timer. »Bios«' styrke maaltessom den mindste mængde, der tilsat substratet gav vækst som netop skitseret. Det vistes, at »bios« kan adskilles fra Br- og Br-vitamin og kan koncentreres, saaledes at ekstraktet giver gær-

vækststimulering i doser paa 0,01 mg pr. cm^3 medium. Koncentratet synes at indeholde en kvælstofholdig substans uden fosfor.

Peskett og O'Brien (1930) fandt ej heller holdepunkter for antagelse af nogen multipel natur af »bios«, idet de ved fraktionering kunde fremstille et præparat, der stimulerede gærvækst i doser helt ned til 0,005 mg pr. cm^3 medium.

Adskillige andre forfattere har dels søgt at koncentrere »bios«, dels vist, at »bios« ikke er en enkelt substans, men bestaar af flere komponenter. Saaledes angav som de første Fulmer og Nelson i 1922, at man af Alfalfa kunde udvinde et ekstrakt ved hjælp af absolut alkohol og et andet ved hjælp af vand, der hver for sig viste optimumskoncentration for stimulering af gærvækst; kombination af begge ekstrakter var langt mere virksom end disse anvendt enkeltvis.

Eastcott (1923), Lucas (1923—24) samt Miller (1924) formaaede ligeledes ad kemisk vej at adskille 2 komponenter »bios« I og II, begge nødvendige for opnaaelse af god gærvækst.

Fulmer, Duecker og Nelson fandt ligeledes »bios« af kompleks natur, da de ved fraktionering kunde paavise 4 forskellige nødvendige gærvækststimulerende faktorer.

At saadanne »bios«-fraktioner ikke kan remplacere B-vitaminet ved rottevækstforsøg fandt Deas 1924.

Eddy, Kerr og Williams angav i 1924 at have isoleret et krystallinsk produkt fra gær med smeltepunkt 223° og visende »bios«-effekt ved 0,005 mg tilsætning pr. cm^3 Fulmers medium F.

Levene og van der Hoeven isolerede 1924 ligeledes fra gær et krystallinsk produkt af analog sammensætning, som det af Eddy og medarbejdere isolerede »bios«, men dette havde dog ingen gærvækststimulerende egenskaber. Ej heller Lucas (1924), der arbejdede med Eddys præparat, kunde paavise den af forff. angivne »bios«-effekt.

Eventuel vækststimulerende evne hos forskellige stoffer overfor forskellige gærstammer, bl. a. Wildiers originale (en *saccharomyces cerevisiae* I Hansen-stamme) undersøgtes 1931 af Williams og Bradway. Det viste sig, at et stof som f. eks. inositol, der stimulerede en gærsort, ikke nødvendigvis havde nogen vækstforøgende virkning overfor flere andre gærsorter o. s. fr.

— Altsaa kræves forskellige slags »bios« til forskellige gær-sorter.

Endelig skal nævnes, at det i 1931 lykkedes for Williams og Truesdail ved elektrolyse at fraktionere Wildiers »bios« i 2 faktorer.

B. *Mikroorganismers evne til B-vitaminsyntese.*

Et problem, der i meget høj grad har beskæftiget talrige forskere, er spørgsmaalet om gærs evne til at syntetisere B-vitamin.

Harden og Zilva (1921) dyrkede gær i en mineralsaltrørsukkeropløsning; det anvendte sukker rekrystalliseredes fra alkohol og rystedes med fullerjord for at fjerne ethvert spor af B-vitamin. Denne gær indeholdt B-vitamin, men tydeligt mindre, end hvis den havde været dyrket i ølurt (paavist ved kurative forsøg paa polyneuritiske duer).

Fulmer, Nelson og Sherwood viste 1921, at man kunde sammensætte et B-vitaminfrit substrat af mineralsalte og 10 % rørsukker, hvori væksten af gær er saa god, at tilsætning af B-vitamin ikke forbedrede denne. Ganske vist optraadte forøget vækst ved tilsætning af alkoholiske ekstrakter af hvedekim og alfalfablade, men det kunde ikke skyldes B-vitamin, idet alkali-behandlede ekstrakter havde samme virkning. Paa ovennævnte substrat kunde Nelson, Fulmer og Cessna (1921) dyrke gær ved kontinuerlige omsaaninger i 1 aar. Den voksede i 50 cm³ medium, hvorfra 1 cm³ hver anden dag overførtes til en ny 50 cm³ portion. Den maksimale koncentration af de oprindelige gærbestanddele vil da efter 180 omsaaninger være $1 \times 50 \div 180$. Hvis der efter et saadant forsøg endnu findes B-vitamin i gæren, maa denne selv have syntetiseret det. Ved fodringsforsøg vistest det, at denne gær indeholdt betydelig B-vitaminmængde.

1922 angav Eijkman, Hoogenhuijze og Derks, at gær dyrket i syntetisk medium ikke formaar at helbrede polyneuritiske duer, hvorimod den samme slags gær dyrket i urt eller risskal-ekstrakt, der har været udsat for 1 times autoklavering ved 120° C formaar dette. Forff. mente, at gæren ved en biologisk resorptionsproces derimod ikke ved fysiokemisk adsorption optager B-vitamin fra substratet eller eventuelt regenererer dette.

Darr fandt 1922 kun lidt B-vitamin i gær dyrket i syntetisk

substrat med tilsætning af B-vitaminfri ekstrakter af kornsor-ter, medens Mac Donald (1922 og 1923) viste, at gær dyrket i mineralsaltsukkeropløsning vokser langsomt, men aabenbart, da den i det hele taget vokser, formaar at danne »bios«. Ved fodringsforsøg med saadan gær, som tillæg til B-vitaminfri kost vokser rotter lige saa godt som kontroldyr med almindelig gær; dette viser, at gæren tillige kan syntetisere B-vitamin.

Heller bekræftede i 1823 Harden og Zilvas resultater, idet de fandt, at ølgær dyrket i Fulmers medium F. formaar at danne B-vitamin, men dog i betydelig mindre grad, end hvis gæren er dyrket i ølurt. Derimod fandt Southgate (1924 og 1927) holdepunkter for, at gæren faar sit B-vitaminindhold fra dyrkningsmediet.

Ved dyrkning i rene mineralsaltsukkeropløsninger viste Hawking (1927) og Peskett samme aar, at gær har evnen til at syntetisere B-vitamin, men det pointeredes, at man nødvendigvis maa sikre sig mod tilblanding af bakterier.

Kennedy og Palmer fandt i 1922 forskelligt indhold af B-vitamin i forskellige gærprøver. Det samme forhold konstateredes af Levene og Muhlfeld i 1923.

I Frankrig har navnlig Randoin og Lecoq gennem talrige forsøg udført i aarene 1926—29 vist en stor forskel paa destillerigær og bryggerigær, idet den første i modsætning til den anden kun fandtes at indeholde lidt af den antineuritisk faktor. Dette synes at staa i forbindelse med dyrkningsmediet, idet destillerigær vokser paa roemelasse, der kun indeholder lidt antineuritisk faktor, medens ølurt er rig paa denne faktor. Forfatterne mente, at gær formaar at syntetisere B_{II}- men ikke B_I-vitamin.

I Tyskland kom Scheunert og Schieblich i 1929 til lignende resultat, idet de fandt, at bryggerigær indeholder 2—3 gange saa meget B_I-vitamin som bagerigær, medens B_{II}-vitaminindholdet er næsten ens for de 2 sorter. Dette fandtes ligeledes af Veselkin, Yaroslavtzeva, Seliber og Booshik i 1929.

Quinn, Whalen og Hartley (1930—31) undersøgte kvantitativt B_I- og B_{II}-vitaminindholdet særskilt i 5 forskellige gærprøver. Det viste sig for B_{II}-vitaminets vedkommende, at de fundne værdier ligger meget tæt op til hinanden, medens B_I-vitaminværdierne varierer mere; navnlig viser bagerigærprøver meget lavt B_I-vitaminindhold.

Drummond og Whitmarsh demonstrerede endelig i 1932 et lignende forhold, idet de dog fandt, at bryggerigær er bagerigæren langt overlegen baade med hensyn til B₁- og B₂-vitaminindhold. Forsøgene udførtes med 4 bageri- og 4 bryggerigærprøver. For at undersøge om forskellen i vitaminindhold skyldes selve gærens art eller dennes vækstbetingelser navnlig dyrkningsmediets sammensætning, foretoges en række dyrkningsforsøg med forskellige gærstammer dels i Readers medium, hvor væksten var langsom, dels i dette efter tilsætning af lidt »bios«. Forsøgene faldt ikke helt entydige ud, men syntes dog at tyde paa, at almindelig bryggeri- og bagerigær i stor udstrækning faar sit B₁-vitaminindhold fra dyrkningssubstratet ved ab- eller adsorption. En gærart, *saccharomyces logos*, formaar dog at syntetisere baade B₁- og B₂-vitamin med vækst i Readers substrat. —

Imidlertid er det ikke alene gærceller, der under visse forhold synes at kunne danne B-vitamin ved vækst i B-vitaminfri substrater. Dette er antagelig ogsaa tilfældet med en del bakterier og svampe, hvilket fremgaar af en del arbejder, som skal gennemgaaes i det følgende.

1906 fandt Kossowicz, at mycoderma stimulerer gærvækst, og Amand (1904) og Ide (1907) angav, at bakterievækst har samme virkning. 1908 viste Martinand og senere i 1911 Kossowicz, at visse svampe ogsaa kan have den modsatte virkning paa gærvækst, idet denne hæmmes. 1919 angav Williams, at tilblanding af bakterier til gærkulturer foraarsager bedre gærvækst.

Linossier, der i 1919—20 arbejdede med dyrkning af svampe, viste, at nogle svampe vokser uden vitamintilsætning paa rene syntetiske substrater, andre ikke, medens Lumière fandt, at skimmelsvampe ikke kræver tilstedeværelse af B-vitamin for at vokse godt.

Robertson, der, som vi tidligere har set, ikke formaaede at dyrke gær i det af ham selv angivne syntetiske substrat, viste 1924, at en del bakterier saasom *coli*, *prodigiosus*, *proteus*, *pyocyaneus*, *subtilis* o. a. kan vokse kontinuerligt heri, medens *difteri*-, *dysenteri*-, *tyfus*-, *paratyfus*-, *kolerabakterier* samt *stafylokokker* ikke kan dette; men efter at den første gruppe bakterier har vokset 10 dage i substratet, findes i dette stoffer, der paa

dette tidspunkt tillader gærsvampe at vokse kontinuerligt i 50 omsaaninger, hvilket forfatteren mente tydede paa, at disse bakterier ved deres vækst danner »bios«. Dette er i 1928 bekræftet af Sunderlin og Werkman.

1927 har Scheunert og Schiebllich og senere i 1929 Schiebllich vist, at *bacillus vulgatus* (Flügge) migula dyrket paa B-vitaminfrit substrat syntetiserer B-vitamin under væksten, idet man har faaet god vækst af B-avitaminotiske rotter ved fodring med en saadan kultur.

En del andre forff. har ligeledes beskæftiget sig med bakteriers B-vitamindannende evne, nemlig Damon (1921 og 1923), Hosoya og Kuroya (1923) o. a. Særlig interessant er resultatet af de undersøgelser, som Bechdel og medarbejdere (1926—28) foretog med kalve, der ernæredes med B-vitaminfattig kost, men alligevel voksede normalt. Forfatterne viste, at dette skyldes en bakterie (*flavobacterium vita rumen*), som lever i kalvens ventrikel; denne bakterie er i stand til saavel her som dyrket i syntetisk substrat at danne B-vitamin.

Til slut skal det af Fridericia og medarbejdere 1926 paaviste fænomen refektion omtales. Refektion kan opstaa »spontan« hos rotter paa B-vitaminfri kost og viser sig ved, at disse i stedet for som sædvanlig paa denne kost at tage hurtigt af i vægt og snart dø giver sig til at vokse samtidig med, at de producerer store mængder voluminøse, hvide, stivelsesrige fæces indeholdende et transmissibelt virus, som det dog ikke er lykkedes at rendyrke. Fodring med saadanne reficerede fæces til rotter paa B-vitaminfri kost foraarsager ofte refektion af disse dyr. Opvarmes fæces derimod inden fodringen skaansomt til 100° C i 10 minutter, dræbes virus, hvorimod dette taaler opvarmning til 80° C i 10 minutter uden at ødelægges. Tilstanden er ligeledes beskrevet af Roscoe o. a.

Af de forannævnte arbejder synes det saaledes at fremgaa, at »bios« i hvert fald for en del gærsorters vedkommende ikke er uundværligt for at opnaa vækst, men at det nærmest maa betragtes som et vækststimulerende princip. Dog synes det, som om nogle gærarter virkelig kræver »bios« for at kunne vokse.

Det synes imidlertid at være bestemt fastslaaet, at »bios« og B-vitamin (i hvert fald B_I- og B_{II}-vitamin) ikke er identiske.

Med hensyn til spørgsmaalet om gærcellers evne til at syntetisere B-vitaminer under deres vækst i B-vitaminfri substrater kan man ikke sige at være naaet til enighed.

Angaaende disse spørgsmaal foreligger en uhyre omfattende litteratur; vi mener dog i det foregaaende at have nævnet et passende uddrag af de vigtigste arbejder med disse problemer. Flere store samle-arbejder, hvori resultaterne fra den nævnte litteratur diskuteres, foreligger; navnlig maa nævnes Tanners artikel 1925 i Chemical Reviews og Pesketts 1933 i Biological Reviews.

3. *Egne undersøgelser.*

1. *Almindelig teknik.*

Af indledningen til dette kapitel fremgaar, at de nødvendige krav ved ethvert forsøg paa dyrkning af gær i B-vitaminfri substrater er følgende:

- 1) B-vitaminfrit (eventuelt »bios«-frit), men iøvrigt sufficient medium fremstillet af absolut rene kemikalier.
- 2) Renkultur af gær, helst udgaaet fra en enkeltcellekultur i saadant medium.
- 3) Sterile og iøvrigt omhyggeligt rensede utensilier.
- 4) Omhyggelig bakteriologisk teknik, saaledes at sterilitet bevares.

Der er ingen tvivl om, at man i adskillige af de ovenfor nævnte arbejder, navnlig de ældre af disse, har forsyndet sig svært mod flere af de nys nævnte betingelser.

Efter at vi havde sat os ind i litteraturen, stod det os klart, at det af Reader angivne substrat maa være velegnet til vort formaal, hvorfor vi valgte at prøve dette. Vi har været saa tilfredse med dette substrat, at vi helt har undladt at prøve andre; kun har vi foretaget forskellige forsøg, som senere skal omtales, med det formaal at sætte gærens vækstintensitet i vejret, uden at disse dog er kommet til at spille nogen rolle for ændring af vor forsøgsteknik.

Mediet har følgende sammensætning: dekstrose 1,0 %, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,3 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,07 %, HK_2PO_4 0,1 %, K_2HPO_4 0,016 %, NaCl 0,05 % og $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,04 %. Det tilberedes ved at opløse saltene hver for sig i den beregnede mængde i lidt kulsyrefrit vand; derefter hældes opløsningerne sammen i en

kolbe i følgende orden: 1) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2) MgSO_4 , 3) NaCl og 4) $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ og tilsidst de forinden sammenblandede opløsninger af de 2 stødpudefosfater; til slut tilsættes resten af den beregnede vandmængde. Denne fremgangsmaade anvendes, da man ved tilsætning af de forskellige salte paa en gang til vandet ikke kan faa alle disse helt opløst.

Til opløsningen anvendes kulsyre-frit vand fremstillet paa den maade, at man ved hjælp af en vakuumpumpe ganske langsomt i $1\frac{1}{2}$ —2 døgn lader luft boble gennem en flaske med frisk destilleret vand; luften skal passere 1) gennem et rør med natronkalk, 2) gennem 50 % KOH-opløsning, derefter 3) gennem 10 % KOH-opløsning og endelig 4) gennem en fenolrødtopløsning (1 g fenolrødt opløst i 500 cm³ destilleret vand tilsat 25—30 cm³ 1/10 n. NaOH-opløsning). Vandet prøves for CO_2 ved tilsætning til en grøn opløsning af bromtymolblaat, der, hvis vandet er CO_2 -frit, skal forblive grøn. Fenolrødtopløsningen maa ikke blive purpurfarvet.

Saltopløsningen steriliseres ved $\frac{1}{2}$ times autoklaving ved 1 atmosfæres overtryk. Derefter tilsættes den afmaalte dekstrose-mængde, hvorpaa substratet dampes i autoklave 3 gange $\frac{1}{2}$ time med 24 timers mellemrum, da dekstrosen ikke taaler autoklaving. Som ingredienser anvendes de reneste Mercks præparater, som kan fremskaffes.

Som gær har vi anvendt en undergærstamme (nr. 113), som venligst er overladt os af Tuborg laboratoriet og senere af os selv rendyrket fra encellekultur i Readers medium.

Alle yore gær dyrkninger er, hvor dette ikke er nærmere angivet, foretaget ved 28° C.

Alle glassager som reagensglas, kolber, pipetter, objektglas o. s. fr., der anvendes ved disse forsøg, renses efter almindelig omhyggelig rengøring ved behandling med en mættet opløsning af kaliumdikromat i svovlsyre, hvorefter man foretager en grundig afskylning med mange hold frisk destilleret vand og tørring. Derpaa steriliseres disse ved 4 timers opvarmning i ovn til 170° C efter indpakning eller overbinding.

Sterilitetsprøver er hyppigt foretaget saavel ved hjælp af direkte mikroskopi af ufarvet og gramfarvet objekt, som ved dyrkningsforsøg baade ved 37° og ved 28° C i almindelig kalve-

bouillon og halvflydende kalvebouillonager; denne sidste fremstilles ved at blande 1 l steril kalvebouillon med 80 cm³ 2½ % steril vandagar, hvorpaa man eftersteriliserer ved dampning. Endvidere har vi talrige gange undersøgt vore gærkulturer for tilblending af vildgær dels ved mikroskopi, dels ved dyrkning paa gipsblokke, steriliseret ved tør opvarmning i 4 timer til 120° C. Vildgær viser saaledes dyrket sporedannelse efter 1—2 døgn i modsætning til kulturgær, hvor dette fænomen er betydelig længere om at indtræde.

2. *Indledende undersøgelser.*

Dyrkningsforsøgene paabegyndtes i august 1932 med en renkultur af tidligere omtalte undergærstamme nr. 113. Forskellige reagensglas indeholdende 7 cm³ Readers substrat tilsaas ved hjælp af pasteurpipette med forskellige antal draaber af en gær-opslemning i ølurt, hvorefter disse glas henstilles i termostat. Der kommer derefter god vækst i glassene med tilsaaning paa 4 draaber og derover i løbet af 2 dage, medens der kun viser sig sparsom vækst i glassene med 1 og 2 draabers tilsaaning. Herefter saas videre paa samme maade fra et glas med god vækst. I glasset med 1 draabes tilsaaning ingen makroskopisk vækst endnu paa syvende dag; derimod kommer paa fjerde dag sparsom vækst i glasset med 2 draabers podning; glasset med 4 draabers podning giver fra fjerde dag moderat vækst, hvorimod der i glasset med 10 draabers podning indtræder god vækst ligeledes fra fjerde dag. Tredie udsaaning foretages derefter fra dette sidste glas paa analog maade; der ses nu god vækst efter 2 dage i glasset med 10 draabers tilsaaning, men først efter 4 dage i glasset, der er tilført 1 draabe. Fjerde udsaaning, der sker fra glasset med 2 draabers tilsaaning, giver god vækst i glassene med 1, 2 og 4 draabers tilsaaning fra tredie dag. Femte podning foretages fra glasset med 1 draabes tilsaaning, og her indtræder god vækst fra tredie dag ligeledes i de mindst tilsaade glas. Sjette tilsaaning sker ligeledes fra glasset med 1 draabes podning, og fra nu af og fremdeles kommer der god vækst paa andet døgn i glassene med 1 draabes tilsaaning.

Man fortsætter nu paa denne maade hver anden-tredie dags 1 draabes-podninger fra reagensglas indeholdende 7 cm³ Readers

substrat, indtil ialt 100 omsaninger paa denne maade er foretaget, hvorefter man ophører hermed; væksten forandrer sig i denne tid ikke.

Disse forsøg viser altsaa, at den anvendte gær synes at behøve 6 passager i Readers medium for heri at vænne sig til at kunne præstere maksimalvækst; endvidere ser man, at man ved omsaninger hver anden-tredie dag har kunnet dyrke gæren uforandret gennem 100 passager, selv om denne i dette substrat vokser ret langsomt og trevnt, betydelig mindre intenst end i gode substrater som f. eks. ølurt.

Da 7 cm³ Readers substrat svarer til ca. 210 draaber med vore sædvanlige pasteurpipetter, vil eventuel vækststimulerende substans- eller B-vitaminindhold i den oprindelige gæropslemning i ølurt efter 100 passager være fortyndet i forholdet 1 : 210¹⁰⁰. Efter ret faa passager er fortyndingen allerede saa stor, at man vanskelig kan tænke sig virkning af saadanne oprindelig tilstedeværende substanser. Indeholder gæren derefter disse, maa den selv have været i stand til at syntetisere dem.

Det fandtes desuden af interesse at undersøge, om det er muligt at videredyrke enkeltcellekulturer af gær, der allerede er vænnet til at vokse i Readers substrat, i dette. Tekniken ved anlæggelse af enkeltcellekulturer kan egentlig ikke kaldes vanskelig, men den kræver dog for at lykkes en del øvelse; dette forklarer maaske en del besvær, vi havde under vore forsøg hermed, idet det i begyndelsen ikke lykkedes os at faa positivt resultat.

Vi har anvendt Lindners draabemetode, som kræver et fugtigt kammer bestaaende af en glasring og et planslebet objektglas samt et i nummererede kvadrater (in casu 16) inddelt dækglass. Objektglasset og glasringen steriliseres ved tør varme, dækglasset ved flambering efter opbevaring i sprit. De 3 glas holdes sammen med lidt vaselin; 1 draabe vand efterlades paa kamrets bund for at forhindre draabernes indtørring. Med steril pasteurpipette sætter man til et sterilt glas med Readers substrat 1 draabe opslemning i dette medium af gær, der gennem en del passager er vænnet til vækst heri. Efter kraftig rystning foretages endnu en passende fortynding og suspension, der skal være af en saadan beskaffenhed, at mange smaadraaber kun indeholder een gærcele. Dette erkendte man sig om ved at foretage en prøvendsætning af draaber paa et dækglass ved hjælp af en

steril pen armeret f. eks. i et almindeligt penneskaft (pennen steriliseres ved flambering, ikke glødning) og mikroskopi af draaberne. Finder man nu, at en del af disse virkelig kun indeholder een gærcele, foretages den endelige draabeafsætning paa bagsiden (ikke talsiden) af det sterile kvadrerede dækglass med en lille draabe i hvert kvadrat. Derefter anbringes dækglasset med draabesiden nedad (altsaa ind mod kamrets rum), hvorpaa man straks opnoterer sig, i hvilke kvadrater man mikroskopisk kun finder een gærcele; det er absolut nødvendigt at arbejde hurtigt, da draaberne i modsat fald tørrer ind, før man faar dækglasset anbragt over det fugtige kammer. Dette opbevares i termostat ved 28° C; man mikroskoperer daglig de omtalte kvadrater for at se, om der kommer vækst. Denne følges, indtil kulturen kan ses tydeligt makroskopisk, hvorpaa den forsigtigt ved hjælp af opsugning i et lille stykke sterilt filtrerpapir overføres til et reagensglas med sterilt Readers substrat, hvorfra kulturen dyrkes videre paa sædvanlig maade, naar væksten er blevet tilstrækkelig. Dette sidste sker imidlertid kun sjældent, antagelig paa grund af substratets manglende indhold af vækststimulantia.

I tilslutning til denne tekniske gennemgang skal vises et eksempel paa et saadant vellykket forsøg, hvor der i et af 16 kvadrater kommer god tilstrækkelig vækst stammende fra en enkelt gærcele.

nr.	Podn.dag	1. dag	2. dag	3. dag	4. dag	5. dag
1	0	0	0			
2	2 sammen	3	3			
3	1	1	1			
4	1 ?	1	1			
5	2	0	0			
6	0	0	0			
7	1	15	ca. 50	ca. 2—300	netop makro- skopisk synlig	podning
8	0	0	0			
9	1	1 ?	1 ?			
10	0	0	0			
11	5	5	5			
12	0	0	0			
13	0	0	0			
14	0	0	0			
15	0	0	0			
16	0	0	0			

Gær stammende fra en saadan enkeltcellekultur i Readers medium er dyrket videre i dette gennem 90 omsaninger ved hjælp af tidligere nævnte teknik.

Efter at have udført 84 passager for vor oprindelige gærkultur og 70 passager for eencellekulturen sender man disse til Tuborglaboratoriet, som venligst har undersøgt dem.

Laboratoriet svarer som følger:

»Den paa Deres anmodning foretagne undersøgelse af 2 gærkulturer, betegnede »84ende omsaaning, 1 draabe« og »eencellekultur 70ende omsaaning, 1 draabe«, i det følgende betegnet I og II, er nu afsluttet med følgende resultat:

Mikroskopisk undersøgelse.

I. Udseende omtrent normalt; cellerne lidt mere granulerede end sædvanligt. Ca. 8 % døde celler. Ejendommelige er nogle faa, store, tykvæggede, afrundede firkantede celler, som dog viser sig at være døde. Der findes ingen forureninger af nogen art.

II. Cellerne gennemgaaende lidt mindre end normalt; indholdet ogsaa her mere granuleret end ellers. 15—20 % døde celler. Ingen abnorme former. Ingen forureninger. Mange af de smaa celler er døde eller halvdøde.

Fysiologisk undersøgelse:

Efter 2 passager i humlet urt undersøges forgæringsbilledet ved forgæring af en større portion ($1\frac{1}{2}$ l) urt i cylinderglass. Til sammenligning føres en stamkultur af nr. 113 under nøjagtig samme forhold.

I. Urtens klaring er knapt saa god som vor stamkulturs, men forskellen er ikke større, end vi kan finde ved forgæringsforsøg med forskellige eencellekulturer af nr. 113. Ligeledes er urtens farve normal efter 4 døgn's gæring. Skumdækket ændrer sig ganske parallelt med stamkulturens, og forgæringsgraden efter 4 døgn er 64,2 % imod stamkulturens 62,8 — en forskel, der er ganske uden betydning. Gæren ligger fast, er sejg af konsistens og ligner fuldstændig stamkulturens.

II. Urtens klaring er lige saa god som stamkulturens, men farveadsorptionen er noget større. Skummet falder lidt hurtigere end de 2 andres, og forgæringsgraden efter 4 døgn er

68,5 %; denne forskel er heller ikke større, end det kan forekomme ved forskellige eencellekulturer. Mere paafaldende er gærens daarlige (løse) afsætning, der formodentlig ligesom farveoptagelsen hidrører fra elektriske ladningsforhold, der afviger lidt fra normalen.

Sammenfattende kan siges, at I er en helt igennem normal 113, medens II afviger saa meget i udseende og fysiologiske egenskaber, saa at den maa siges at repræsentere en svagt muteret form.«

(sign. *B. Krause*, Laboratorieførstander).

3. *Vor gær dyrkningsteknik.*

Efter 25 omsaaninger af eencellekulturen undersøges denne grundigt for tilblanding af vildgær, bakterier og svampe paa tidligere omtalte maader med negativt resultat; derefter anvendes denne til gennem forsøg paa dyrkning i noget større stil at fremskaffe en vis mængde gær tilstrækkelig til, at en biologisk B-vitaminanalyse kan foretages.

2 l's erlenmeyerkolber indeholdende et ca. 2 cm højt lag af Readers substrat for at skabe saa stor overflade som muligt tilsaas med nævnte gærkultur. Kolberne tages ofte ud af termostaten og rystes lempeligt. Efter 8 dages vækst centrifugeres gærbundfaldet fra, bringes over i et reagensglas og opbevares i frigidaire til senere brug. 10—12 kolber giver paa 8 dage ca. 5—6 cm³ gærgrød. Hver ottende dag tilsaas ny kolber; dette udføres efter omhyggelig flampering af begge kolbers halse og direkte overhældning af lidt gæropslemning fra den ene kolbe til den anden, der indeholder frisk Readers medium. Dette viser sig i praksis at lykkes godt, idet blandingsinfektion kun sjældent er indtraadt. Hver gang dette er sket, ses det ganske tydeligt makroskopisk, idet væksten helt skifter karakter. I saa fald kasseres kolbens indhold naturligvis. 1 gang har vi saaledes forurening med en vildgær, der vokser ligesom agglutineret paa kolbens bund. Oftest bestaar forureningen af hvide overfladesvampe, enkelte gange af traadede svampe. Det er interessant at bemærke, at vækst af saadanne svampe altid samtidig giver forøget gærvækst.

Talrige gange har vi foretaget sterilitetsprøver, som tidligere

beskrevet, men det er aldrig lykkedes os at paavise bakteriel forurening. I de ovenfor nævnte tilfælde har blandingsinfektionen som omtalt altid givet sig makroskopisk til kende, saaledes at man uden nogen vanskelighed har kunnet undgaa at føre forureningen videre. Aarsagen til, at vi ganske har undgaaet bakteriel forurening, maa dels være overholdelse af omhyggelig bakteriologisk teknik, dels Readersubstratets lave pH (5,8), ved hvilken brintjonkoncentration bakterievækst hæmmes. (Saavel colibakterier som gule stafylokokker er det dog lykkedes os at dyrke i Readers medium).

Gennem talrige passager som ovenfor beskrevet, fortsættes denne gær dyrkning i 1½ aar, hvorefter denne midlertidig delvis afbrydes, idet vi dog stadig ved fortsatte passager holder gæren i live. En paa ny foretaget sterilitetsprøve viser ingen blandingsinfektion.

Samtidig tilsendes Tuborglaboratoriet 2 kulturer til nøjere undersøgelse.

Laboratoriet svarer som følger:

»Undersøgelsen af de 2 gærkulturer er nu afsluttet, og vore indtryk kan vi resumere i følgende: 3 dage efter modtagelsen har cellerne i begge kulturer samme udseende; størrelsen er normal, men formen er kuglerund i stedet for den normale æg-lignende. Indholdet er stærkt granuleret som hos gamle celler, men der er ret livlig knopskydning. Der findes ingen forurening med andre mikroorganismer.

Ved ompodning paa urt finder vi efter 10 dages forløb et ligeledes for begge kulturer ensartet udseende: kuglerunde, ret store (større end normalt) celler med store vakuoler. Der findes en del langstrakte celler med tendens til dannelse af involutionsformer.

Herfra podes (med saa vidt muligt samme mængde gær) 2 cylinderglass hvert med 1½ l pilsnerurt. Efter 5 døgn's forløb er den tilsyneladende forgæringsgrad i det ene glas 44,4 %, hvilket er væsentlig lavere end normalt, i det andet 57,5 %, hvilket ogsaa er lavt, men dog ikke paafaldende. I begge glas er i overensstemmelse hermed saavel klaringen som gærafsætningen daarlig. Den mikroskopiske undersøgelse viser nu, at størsteparten af cellerne har det normale udseende: ægformede, svagt granu-

lerede celler i hobe paa 3—5, men desuden findes i begge kulturer et ikke ubetydeligt antal langstrakte celler, hvoraf enkelte har typisk involutionsform. Det er vort indtryk, at den langvarige dyrkning under forhold, der afviger stærkt fra det normale, har givet anledning til, at en del af cellerne er muterede, medens størsteparten kan genoptage deres oprindelige form, naar de kommer under normale forhold.«

(Sign. B. Krause).

Vi er saaledes sikre paa, at vi stedse har arbejdet med en renkultur af undergær nr. 113.

Den opbevarede gær samles paa et büchnerfilter, reagensglasene skylles med lidt destilleret vand, og væsken frafiltreres under sugning. Gæren tørres derefter i en varmekssikator (20—50° C) ved vakuum over klorkalk. Naar gæren er tør, males den. Udbyttet bliver ialt 44,5 g gærpulver, som opbevares tørt i glas med slebet glasprop ved stuetemperatur. Tørstofindholdet bestemmes til 93,8 %.

44,5 g torgær opnaaet i løbet af 1½ aars dyrkning er et meget magert resultat. Det gælder derfor i høj grad om at økonomisere med den saaledes tilvejebragte gær. Da man maa regne med, at den i lang tid opbevarede gær kan have mistet noget af sin B-vitaminpotens, maa man nødvendigvis skaffe frisk gær dyrket paa samme maade til veje. Dels som følge heraf, dels paa grund af det ønskelige i at faa mere saadan gær til disposition, gentages gærdyrkningen i større stil paa den tidligere angivne maade og bruges, som senere vil blive beskrevet, til dyrefodringsforsøg i frisk tilstand, hver gang en mindre portion er disponibel.

Da vi endvidere ønsker at vide, hvor meget vor gær nr. 113 indholder af B_I- og B_{II}-vitamin efter dyrkning i ølurt, overføres denne efter de 1½ aars kontinuerlige dyrkning i Readers substrat til urt. Paa grund af manglende dertil specielt egnede utensilier udføres disse forsøg paa Tuborglaboratoriet under elskværdig vejledning af laboratoriets forstander.

1 cm³ gærsuspension i Readers substrat tilsættes en række pasteurkolber, hver indeholdende 150 cm³ humlet urt. Efter 7 dages gæring benyttes hele pasteurkolbens indhold til podning paa carlsbergkolber, hvor hver af disse indeholder 9 l steril

uhumlet urt. (Den uhumlede urt anvendes for at undgaa humlens bitre smag, som muligvis vil genere forsøgsdyrene). Naar gæren har vokset 7 dage heri, tømmes kolberne, indholdet centrifugeres, og gæren behandles paa den tidligere for den syntetiske gærs vedkommende angivne maade og opbevares tørt.

En del af urten filtreres gennem bakterietætte filtre og inddampes 1 : 8 in vacuo ved 40° C. Det samme foretages med en del Readers medium, der er anvendt til gær dyrkning som tidligere beskrevet. Endelig inddampes en portion af ovenfor nævnte uhumlede urt, der ikke har været anvendt til gær dyrkning, ligeledes som 1 : 8 for senere at anvendes ved fodringsforsøg paa rotter.

4. *Forskellige forsøg paa acceleration af gærvækst i syntetisk substrat.*

Da væksten af gæren i Readers substrat, som vi har set, foregaar saa langsomt, har det været et stort og navnlig langtrukket arbejde at skaffe os den ønskede gærmængde.

Vi har derfor paa forskellige maader forsøgt at raade bod paa denne langsomme gærvækst.

Ved fremstillingen af bagerigær (spritgær), som dyrkes paa et forholdsvis magert substrat som roesuktermelasse tilsat ammoniumsalte som kvælstofkilde, anvendes med stor effekt udluftning under dyrkningen ved hjælp af luftgennemledning, hvorved gæren formerer sig mange gange bedre, end hvis dette undlades. Vi har forsøgt dette, men da luften til vort formaal nødvendigvis skal være steril, maa vi drage omsorg for, at dette er tilfældet.

I dette øjemed konstrueres et lille apparat, som bestaar af et langt spiralsnoet kobberrør; rørets lange tilførende og fraførende ender føres ombøjede ned gennem en beholder med stadig strømmende koldt vand. Under luftgennemledningen, som foretages fra laboratoriets trykluftledninger, der gennem en hane paa ledningssystemet reguleres passende, passerer luften inden i kobberspiralen, der udvendig opvarmes kraftigt til glødhede i hele sin udstrækning af en stærk bunsenbrænder. Igennem en i forvejen steriliseret gummislange ledes luften gennem et hul i siden paa termostaten videre gennem et ligeledes steriliseret

glasrør i en stadig strøm gennem substratet. Glasrøret ender i en af mange huller perforeret glaskugle, hvorigennem luften ledes. Dyrkningsglasset er tillukket med en dobbelt perforeret gummiprop; gennem hullerne gaar dels det ovennævnte glasrør dels et andet indeholdende en lille vatprop, der tillader luftens gennemtrængen.

Man ser imidlertid ingen forskel i gærvækstintensitet trods adskillige dages gennemledning af luft. I kontrolglasset uden luftgennemledning er gærvæksten ligesaa kraftig. At luften har været steril, ser man dels ved undersøgelse af gærbundfaldet, hvori ingen bakterier paavises, dels ved at lade luften passere et glas med bouillon i 1 døgn, hvorefter bouillonglasset sættes i termostat ved 37° C uden at bakterievækst indtræder.

Da, som tidligere omtalt, »bios« kan adskilles fra B-vitamin, har vi ved hjælp af følgende enkle metode hertil, som elskværdigst personligt er meddelt os af Drummond, fremstillet et »bios«-koncentrat. 1 kg frisk presset bryggeriovergær omrøres med 3 l kogende vand i $1\frac{1}{4}$ time. Det efter filtrering klare vandige ekstrakt fældes med et let overskud af blyacetat, hvorved der fremkommer et kraftigt bundfald bl. a. indeholdende størstedelen af B_{II}-vitaminet. Filtratet frigøres for bly med svovlsyre og behandles derefter med en 5 % svovlsur opløsning af fosforwolframsyre; det derved fremkomne bundfald indeholder størstedelen af B_I-vitaminet, medens filtratet udelukkende indeholder »bios« uden tilblanding af B_I- eller B_{II}-vitamin. Dette behandles med bariumhydroksydopløsning for at bortskaffe fosforwolframsyren og derefter med svovlsyre for at bortskaffe barium. Til slut inddampes ekstraktet til 1 l og fremtræder nu som en klar lysegul væske. Denne steriliseres ved filtrering gennem sterilt bakterietæt seitzfilter (sterilitetsprøve).

Dette ekstrakt er prøvet for B-vitaminindhold paa rotter uden at saadant har kunnet paavises. Ekstraktets gærvækststimulerende indflydelse undersøges ved tilsætning af forskellig mængde til en række glas, alle indeholdende 7 cm³ Readers substrat og alle tilsaaet med 1 draabe af samme gælkultur. Skematisk tager forsøget sig saaledes ud:

	0 „bios“	+ 1 dr. „bios“	+ 2 dr. „bios“	+ 4 dr. „bios“	+ 8 dr. „bios“	+ 16 dr. „bios“	+ 32 dr. „bios“
1. dag	+ diffus og bundf.	++ diffus og bundf.	+++ diffus og bundf.	++ kun bundfald	+ kun bundfald	0	0
2. „	+++ do.	+++ do.	+++ do.	++ do.	+ do.	0	0
3. „	+++ do.	++ do.	+++ do.	++ do.	++ do.	0	0
4. „	++ do.	++ do.	+++ do.	++ do.	++ do.	0	0

Vi ser altsaa, at der findes en optimumskoncentration af »bios«, som in casu ligger ved 2 draaber »bios«-tilsætning til 7 cm³ Readers medium. Større mængde »bios« giver komplet hæmmet gærvækst. 4 og 8 draabers tilsætning til ovennævnte mængde Readers substrat viser foruden hæmmet gærvækst tillige det forhold, at gæren ikke, som det ellers er tilfældet, vokser saavel med bundfald som diffust, men her kun giver et fast, kompakt bundfald.

Det lykkes os imidlertid ikke ved forsøg paa at anvende dette »bios«-ekstrakt som tilsætning i den beregnede optimale mængde til Readers substrat at forøge vort gærudbytte ved dyrkning af vor gær i større kolber, idet væksten makroskopisk bedømt falder ganske ens ud i 5 prøvekolber som i 5 kontrolkolber, der kun indeholder Readerssubstrat.

Endnu et forsøg foretages med henblik paa gærvækst-acceleration:

I almindelig pilsnerstamurt vokser undergær nr. 113 hurtigt og kraftigt. Hvis man kunde ødelægge alt B-vitamin i saadan urt, uden at de gærvækststimulerende stoffer hæmmedes, vilde vi til vort formaal kunne anvende en saadan behandlet urt. Dette forsøges, idet en almindelig pilsnerstamurt med pH 5,8 (paa Tuborglaboratoriet) autoklaveres 4 timer i en speciel kraftigt bygget autoklave ved 5—6 atmosfærers overtryk. pH maales til 3,9 efter autoklaveringen. En anden portion af samme slags urt alkaliseres med natriumhydroksyd til pH 9,2 og autoklaveres samme tid ved samme tryk. Her findes pH ved 3,5 efter autoklaveringen. Endelig disponeres over en tredie portion af samme slags urt, som blot steriliseres ved 3 gange dampning i 1/2 time med 1 døgn mellemrum.

Disse 3 urtportioner anvendes til vækstforsøg med vor gær efter tidligere omtalte skema. Glassene aflæses efter 10 dages vækst ved 28° C. Vækststyrken betegnes skønsmæssigt med plusser, idet 1 plus angiver sparsom vækst; 2: moderat vækst, 3: god vækst, 4: stærk vækst, 5: kraftig vækst og 6: meget kraftig vækst.

Draaber ølurt	0	1	2	4	8	16	32	64
Alm. pilsnerurt	++++	++- - -	++++-	+++++	++++-	+++++	+++++	+++++
do. surt autoklaveret	++++	++++-	++++	++- - -	++++	++- - -	++++	(+)
do. alkalisk "	+++	++++	++-	++- - -	++++	+++	(+)	(+)

Man ser altsaa, at medens stigende tilsætning af almindelig ølurt giver stadig øget gærvækst indenfor forsøgets rammer, giver begge de autoklaverede ølurtpøver indenfor et ganske bestemt ret snævert koncentrationsomraade en forholdsvis ringe vækstforøgelse, som ved stigende koncentrationer gaar over i en væksthæmning. Man kan altsaa heller ikke ved brug af ovennævnte ekstrakter vente at opnaa nogen væsentlig gærvækst-acceleration.

Brintjonkoncentrationens indflydelse paa vor gærs vækst i Readers substrat er tillige undersøgt. Elektrometriske maalinge i Readers substrat indeholdende 0,1 % primært og 0,016 % sekundært surt kaliumfosfat viser, at pH ligger ved 5,8. Ved at forandre mængden af stødpuderne udmaales elektrometrisk en række forskellige pH-værdier, idet man for hver ny værdi tilbereder 50 cm³ af iøvrigt uforandret Readerssubstrat.

Surt kaliumfosfat						
Nr. 1.	0,05 g	primært	+	0,008 g	sekundært:	pH = 5,80
» 2.	0,05 »	»	+	0,05 »	»	» = 6,55
» 3.	0,5 »	»	+	0,01 »	»	» = 5,00
» 4.	1,0 »	»	+	0,01 »	»	» = 4,75
» 5.	3,0 »	»	+	0,01 »	»	» = 4,50
» 6.	3,0 »	»	+	0 »	»	» = 4,40

Man gaar nu ud fra en 2 dage gammel kultur af vor gær i Readers medium og danner af denne en opslemning, der efter grundig omrystning viser sig at indeholde ca. 3200 gærceller pr. mm³. Af hver af de ovennævnte pH-koncentrationer tilberedes 3 glas, hvert indeholdende 5 cm³ (modificeret) Reader substrat; disse tilsaas alle ved hjælp af samme pasteurpipette med 1 draabe af denne opslemning.

Derefter foretages saa hurtigt som muligt en ny tælling, og denne gentages efter 1 og 2 døgn i alle glassene. Resultaterne af disse tællinger ses af følgende opstilling:

	primær tælling	tælling efter 1 døgn	tælling efter 2 døgn
nr. 1 pH 5,80	$\begin{matrix} 0 \\ 3 \\ 3 \end{matrix} \left\{ \begin{matrix} 2 \times 250 = 500/\text{mm}^3 \end{matrix} \right.$	$\begin{matrix} 104 \\ 51 \\ 94 \end{matrix} \left\{ \begin{matrix} 83 \times 250 = 20750/\text{mm}^3 \end{matrix} \right.$	$\begin{matrix} 441 \\ 302 \\ 477 \end{matrix} \left\{ \begin{matrix} 406,7 \times 250 = 101675/\text{mm}^3 \end{matrix} \right.$
nr. 2 pH 6,55	$\begin{matrix} 3 \\ 1 \\ 4 \end{matrix} \left\{ \begin{matrix} 2,7 \times 250 = 675/\text{mm}^3 \end{matrix} \right.$	$\begin{matrix} 10 \\ 14 \\ 28 \end{matrix} \left\{ \begin{matrix} 17,3 \times 250 = 4325/\text{mm}^3 \end{matrix} \right.$	$\begin{matrix} 147 \\ 388 \\ 162 \end{matrix} \left\{ \begin{matrix} 232,3 \times 250 = 58075/\text{mm}^3 \end{matrix} \right.$
nr. 3 pH 5,00	$\begin{matrix} 0 \\ 2 \\ 2 \end{matrix} \left\{ \begin{matrix} 1,3 \times 250 = 325/\text{mm}^3 \end{matrix} \right.$	$\begin{matrix} 44 \\ 77 \\ 109 \end{matrix} \left\{ \begin{matrix} 76,7 \times 250 = 19175/\text{mm}^3 \end{matrix} \right.$	$\begin{matrix} 466 \\ 466 \\ 468 \end{matrix} \left\{ \begin{matrix} 466,7 \times 250 = 116675/\text{mm}^3 \end{matrix} \right.$
nr. 4 pH 4,75	$\begin{matrix} 2 \\ 2 \\ 1 \end{matrix} \left\{ \begin{matrix} 1,7 \times 250 = 425/\text{mm}^3 \end{matrix} \right.$	$\begin{matrix} 42 \\ 64 \\ 53 \end{matrix} \left\{ \begin{matrix} 53 \times 250 = 13250/\text{mm}^3 \end{matrix} \right.$	$\begin{matrix} 415 \\ 398 \\ 453 \end{matrix} \left\{ \begin{matrix} 422 \times 250 = 105500/\text{mm}^3 \end{matrix} \right.$
nr. 5 pH 4,50	$\begin{matrix} 1 \\ 1 \\ 1 \end{matrix} \left\{ \begin{matrix} 1 \times 250 = 250/\text{mm}^3 \end{matrix} \right.$	$\begin{matrix} 44 \\ 35 \\ 30 \end{matrix} \left\{ \begin{matrix} 36 \times 250 = 9000/\text{mm}^3 \end{matrix} \right.$	$\begin{matrix} 412 \\ 472 \\ 505 \end{matrix} \left\{ \begin{matrix} 463 \times 250 = 115750/\text{mm}^3 \end{matrix} \right.$
nr. 6 pH 4,40	$\begin{matrix} 4 \\ 3 \\ 3 \end{matrix} \left\{ \begin{matrix} 3,3 \times 250 = 825/\text{mm}^3 \end{matrix} \right.$	$\begin{matrix} 43 \\ 63 \\ 55 \end{matrix} \left\{ \begin{matrix} 54 \times 250 = 13500/\text{mm}^3 \end{matrix} \right.$	$\begin{matrix} 499 \\ 417 \\ 510 \end{matrix} \left\{ \begin{matrix} 475,3 \times 250 = 118825/\text{mm}^3 \end{matrix} \right.$

Udregningerne er foretaget ved i Thoma's tællekammer at tælle antallet af gærceller i 12 store kvadrater; gennemsnitstallet heraf multipliceres med $4000 : 16 = 250$ for at faa antallet pr. mm^3 .

Man ser, at man i virkeligheden arbejder ret unøjagtigt med den her anvendte metode, idet tællingerne falder meget uregelmæssigt ud trods energisk og langvarig rystning med glaskugler i glassene for at adskille sammenhobede gærceller saa godt som muligt. Dog synes tallene efter flere døgns vækst nogenlunde at udjævnes, saaledes at man formentlig kan slutte, at de brintjonforskelle, det her drejer sig om, ikke foraarsager større vækstforskelligheder af vor gær i Readers substrat, thi efter 16 døgns vækst kan man makroskopisk ikke se forskel paa gærmængden i de forskellige glas, ej heller i de 3 glas, hvor pH ligger ved 6,55, og hvori vore tællinger viser noget lavere værdier, end tilfældet er for de andre glas.

Endelig har vi interesseret os for, om tilsætning til Readers substrat af Peters B_I-vitaminekstrakt eller vort B_{II}-vitaminekstrakt har stimulerende indflydelse paa vor undergærstammes vækst. Resultatet af disse undersøgelser fremgaar af følgende skematiske fremstilling:

Glas nr.		24 timer				48 timer				96 timer				7 døgn			
1.	Readers substrat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
2.	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
3.	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
4.	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
5.	»	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
6.	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
7.	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
8.	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
9.	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
10.	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
11.	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
12.	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
13.	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
14.	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
15.	»	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
		+ 1 dr. Peters ekstr.															
		+ 2 »															
		+ 4 »															
		+ 8 »															
		+ 16 »															
		+ 24 »															
		+ 1 dr. Br-ekstr.															
		+ 2 »															
		+ 4 »															
		+ 8 »															
		+ 16 »															
		+ 24 »															
		+ 100 »															
		+ 150 »															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															
		»															

Man ser, at der indtræder en tydelig gærvæksthæmning ved tilsætning af 8 draaber Peters ekstrakt og derover til 7 cm³ Readers medium; hvorimod noget saadant ikke indtræder ved anvendelse af vort B_{II}-ekstrakt. Da Peters ekstrakt er ca. 13 gange saa koncentreret et produkt som vort B_{II}-vitaminekstrakt og som følge heraf 8 draaber Peters ekstrakt svarer til ca. 100 draaber B_{II}-ekstrakt, forsøger man, om der indtræffer hæmning ved tilsætning af disse store mængder B_{II}-ekstrakt, men dette er ikke tilfældet. Da uautoklaveret gærekstrakt, der indeholder store B_I- og B_{II}-vitaminmængder i alle koncentrationer virker stimulerende paa gærvækst, skyldes den ved Peters ekstraktet observerede hæmning altsaa ikke dets B_I-vitaminindhold, men antagelig tilstedeværelsen af smaa mængder af forskellige kemiske stoffer, der har været anvendt ved dettes fremstilling.

5. *Indhold af B_I- og B_{II}-vitamin i overgær, undergær og spritgær.*

Naar vi nu gaar over til at undersøge B_I- og B_{II}-vitaminindholdet ved hjælp af vor metode i forskellig gær, vælger vi først de 3 gærsorter, som man hyppigst her i landet anvender og kommer i berøring med, nemlig bryggerigær og bagerigær (spritgær). Med hensyn til bryggerigæren maa man skelne mellem overgær, som anvendes under produktionen af alkoholsvage øltyper, og undergær, som anvendes ved fremstillingen af øl af bajerskøltypen. Hvert bryggeri anvender som regel kun en eller højst nogle faa gærstammer, medens disse ofte er forskellige for forskellige bryggerier.

Ovennævnte gærsorter er leveret os som frisk presse-gær; overgæren stammer fra Kongens Bryghus, undergæren fra Tubborgs Fabriker og bagerigæren fra De danske Spritfabrikers Gærcentral. Alle 3 gærsorter er behandlet nøjagtig ens paa den i andet kapitel andet afsnit beskrevne maade.

Gæren afvejes og gives dyrene særskilt i smaa porcelænsskaale i daglige doser, idet den udrøres med lidt vand for lettere at kunne konsumeres af rotterne.

Dyrenes vækst ses dels af tavle LV—LVII og dels af efterfølgende tabeller.

TABEL 14.

*Overgær (91,5 % tørstof)**B_I-vitaminindhold:*

	0,10 g	Begyndelsesvægt	5 ugers vægt	5 ugers vægtforøgelse
Dyr nr. 829		37 g	75 g	39 g
» » 1013		39 »	75 »	36 »
» » 1014		33 »	94 »	61 »
» » 1073		29 »	91 »	62 »
» » 1085		45 »	99 »	54 »

gennemsnitlig vægtforøgelse i 5 uger: 50,4 g.

$$\log x = 0,128 + 0,0085 (50,4 \div 60) \pm 0,11$$

$$x = 1,113 (0,8638 - 1,434).$$

1 g overgær (100 % tørstof) = 12,1 (9,4 — 15,6) internationale Br-vitaminenheder.

TABEL 15.

B_{II}-vitaminindhold:

	0,20 g	Begyndelsesvægt	7 ugers vægt	7 ugers vægtforøgelse
Dyr nr. 823		34 g	93 g	59 g
» » 1076		28 »	68 »	40 »
» » 1077		28 »	74 »	46 »
» » 1078		25 »	74 »	49 »
» » 1081		30 »	96 »	66 »

gennemsnitlig vægtforøgelse i 7 uger: 52,0 g.

$$\log x = 0,054 + 0,0101 (52 \div 70) \pm 0,11$$

$$x = 0,7450 (0,5784 - 0,9598).$$

1 g overgær (100 % tørstof) = 4,0 (3,2 — 5,4) af vore B_{II}-vitaminenheder.

TABEL 16.

*Undergær (93 % tørstof)**B_I-vitaminindhold:*

	0,025 g	Begyndelsesvægt	5 ugers vægt	5 ugers vægtforøgelse
Dyr nr. 857		31 g	68 g	37 g
» » 930		34 »	84 »	50 »
» » 955		41 »	83 »	42 »
» » 1070		38 »	69 »	31 »
» » 1072		34 »	55 »	21 »

gennemsnitlig vægtforøgelse i 5 uger: 36,2 g.

$$\log x = 0,128 + 0,0085 (36,2 \div 60) \pm 0,11$$

$$x = 0,8427 (0,6540 - 1,085).$$

1 g undergær (100 % tørstof) = 36,1 (28,0 — 46,4) internationale B_I-vitaminenheder.

TABEL 17.

B₁₂-vitaminindhold:

	0,40 g	Begyndelsesvægt	7 ugers vægt	7 ugers vægtforøgelse
Dyr nr. 861		25 g	142 g	116 g
» » 862		33 »	150 »	117 »
» » 863		37 »	163 »	126 »
» » 865		29 »	114 »	85 »
» » 869		38 »	156 »	118 »

gennemsnitlig vægtforøgelse i 7 uger: 112,4 g.

$$\log x = 0,054 + 0,0101 (112,4 \div 70) \pm 0,11$$

$$x = 3,035 (2,37 - 3,91).$$

1 g undergær (100 % tørstof) = 8,1 (6,3 — 10,5) af vore B₁₂-vitaminenheder.

TABEL 18.

*Bagerigær (88,2 % tørstof)**B₁-vitaminindhold:*

	0,25 g	Begyndelsesvægt	5 ugers vægt	5 ugers vægtforøgelse
Dyr nr. 847		42 g	83 g	41 g
» » 850		39 »	81 »	42 »
» » 950		38 »	91 »	53 »
» » 1068		36 »	66 »	30 »
» » 1069		43 »	71 »	28 »

gennemsnitlig vægtforøgelse i 5 uger: 38,8 g.

$$\log x = 0,128 + 0,0085 (38,8 \div 60) \pm 0,11$$

$$x = 0,8868 (0,6884 - 1,142).$$

1 g bagerigær (100 % tørstof) = 4,0 (3,1 — 5,1) internationale B₁-vitaminenheder.

TABEL 19.

B₁₂-vitaminindhold:

	0,10 g	Begyndelsesvægt	7 ugers vægt	7 ugers vægtforøgelse
Dyr nr. 825		35 g	77 g	42 g
» » 826		31 »	80 »	49 »
» » 852		30 »	65 »	35 »
» » 853		34 »	76 »	42 »
» » 1067		34 »	75 »	41 »

gennemsnitlig vægtforøgelse i 7 uger: 41,8 g.

$$\log x = 0,054 + 0,0101 (41,8 \div 70) \pm 0,11$$

$$x = 0,5878 (0,4562 - 0,7572).$$

1 g bagerigær (100 % tørstof) = 6,6 (5,1 — 8,5) af vore B₁₂-vitaminenheder.

Heraf ser man altsaa, at medens B_I-vitaminindholdet varierer betydeligt — for overgær, undergær og bagerigær henholdsvis 12,1, 13,6 og 4,0 internationale B_I-vitaminenheder pr. g — ligger B_{II}-vitaminindholdet mere fast — nemlig ved henholdsvis 4,0 , 8,1 og 6,6 af vore B_{II}-vitaminenheder. —

Disse enheder for saavel B_I- som for B_{II}-vitaminets vedkommende ligger, som vi erindrer, meget nær det tidligere benyttede begreb: effektiv kurativ rottetøsis.

Det fremgaar saaledes, at man med henblik paa fremstilling af B_I-vitaminkoncentrater med større fordel kan anvende undergær end overgær. Derimod bør bagerigæren sikkert foretrækkes til fremstilling af B_{II}-vitaminkoncentrater paa grund af godt B_{II}-vitaminindhold og meget ringe B_I-vitaminindhold.

Det maa til slut pointeres, at disse resultater kun gælder for de omtalte gærsorter, saalænge de samme gærstammer anvendes, og disses dyrkningsmetoder holdes konstant. Ændringer af disse forhold vil kunne medføre forandringer i vitaminindholdet.

6. Indhold af B_I- og B_{II}-vitamin i Readers substrat.

Dette er undersøgt paa en speciel maade, idet man har undersøgt glukosen for sig og saltene samlet for sig. Ved undersøgelsen af glukosen har man erstattet stivelsen i grundkosten med glukosen, og derefter givet kosten sammen med sufficient B_I- eller sufficient B_{II}-vitaminmængde.

Det ses af tavle LVIII, hvor dyr nr. 931 og 932 har faaet glukosebasalkost og B_{II}-vitamin og dyr nr. 933 og 934 glukosebasalkost og B_I-vitamin, at glukosen ikke indeholder paaviseelige mængder B_I- eller B_{II}-vitamin.

Saltene i Readers substrat prøves ligeledes for B_I- og B_{II}-vitaminindhold ved paa sædvanlig maade at give dem som tillæg til kosten. Af kurverne nr. 922 og 958 paa tavle LVIII ser man, at Readersaltene intet B_I-vitamin indeholder i de af dyrene forærede doser, som ligger mellem 3—0,5 g pro die faldende henimod det tidspunkt, hvor døden indtræder. Af kurverne nr. 924 og 956 ses, at ej heller B_{II}-vitamin kan paavises i Readersaltet; dyrene spiser her fra 2—0,5 g daglig.

Det er altsaa ikke lykkedes at paavise B_I- eller B_{II}-vitamin i Readers medium, som derfor i denne henseende har vist sig at være et til vort formaal velegnet substrat.

7. Indhold af B_I- og B_{II}-vitamin i syntetisk gær.

Da vi nylig har set, at 0,4 g er en passende daglig dosis af undergær som B_{II}-vitaminkilde, forsøger vi nu denne dosis som tillæg til vor basalkost og sufficient B_I-vitamin som Peters ekstrakt, men paa grund af den sparsomme mængde, der staar til disposition, anvendes kun 1 dyr, og væksten fortsættes kun i 5 uger. — Tavle LIX, dyr nr. 899. Det viser sig, at dyret vokser godt og i den nævnte tid tager 41 g paa i vægt, d. v. s. ca. 8,2 g pr. uge; dette er dog kun ca. halvt saa meget som de dyr, der er undersøgt med teknisk bryggeriundergær af samme stamme. Et andet dyr (nr. 901), der faar nøjagtig den halve dosis syntetisk undergær, viser dog den samme 5 ugers vægtforøgelse, nemlig 41 g; et tredie dyr (nr. 973) vokser i 18 dage paa 0,20 g daglig dosis ca. 1,3 g om dagen, hvilket giver ca. 9 g pr. uge. Endelig har vi prøvet 1 dyr (nr. 1012) med 0,20 g frisk syntetisk torgær om dagen. Denne gær, hvis tørstofindhold ligeledes er 93,8 %, er ikke over 2 maaneder gammel, størstedelen væsentlig yngre, idet den stadig er fremstillet, indtil man ikke længere formaaede at holde trit med forbruget. Her vokser dyret 7,2 g pr. uge i 5 uger, altsaa stadig tal af nogenlunde samme størrelsesorden.

Selv om man maa være varsom med at slutte fra 4 dyr, der har vokset saa kort tid, som det her drejer sig om, saa tyder disse forsøg dog paa, at undergær, der er dyrket i syntetisk substrat, næppe herved faar sit B_{II}-vitaminindhold væsentlig formindsket.

Derimod er det sikkert, at da Readers substrat intet paaviseeligt B_{II}-vitamin indeholder, maa gæren altsaa selv have formaaet at syntetisere B_{II}-vitamin.

Dernæst forsøger vi at bestemme den syntetiske gærs B_I-vitaminindhold. Vi giver først et dyr (nr. 911) en dosis paa 0,08 g daglig af vor gær som tillæg til B_{II}-vitaminholdig kost, idet vi tidligere har vist, at 0,025 g undergær kun foraarsager gennemsnitlig 7,2 g vægtforøgelse pr. uge. Det viser sig imidlertid, at dette dyr dør efter 4 ugers forløb efter at have frembudt kraftige symptomer paa beri-beri og uden at have taget det mindste paa i vægt, hvilket altsaa viser, at denne gærmængde kun indeholder minimal B_I-vitaminmængde, meget mindre end almindelig undergær.

At gæren imidlertid indeholder B_I-vitamin, ser man ved betragtning af kurve nr. 921 og 972, hvor dyrene henholdsvis har faaet 0,5 og 0,25 g undergær daglig og vokser henholdsvis 69 g i 19 dage (ca. 25 g pr. uge) og 57 g i 18 dage (ca. 22 g pr. uge). For at se om denne gær har tabt væsentligt i B_I-vitaminpotens ved opbevaring, gives i 5 uger — saa længe forraad haves — frisk syntetisk undergær, der ikke er over 2 maaneder gammel, i daglige doser paa 0,25 g (dyr 1011). Herved ser man, at dyret i denne tid vokser ialt 104 g, altsaa ca. 21 g pr. uge. Dette svarer godt i størrelsesorden til ovennævnte, hvoraf man nok kan tillade sig at slutte, at nogen væsentlig nedsættelse af B_I-vitaminstyrke har gæren næppe undergaaet ved opbevaringen.

Da Readers substrat ikke indeholder maalelige mængder B_I-vitamin, og undergæren efter dyrkning heri altsaa indeholder B_I-vitamin, maa den altsaa have syntetiseret denne.

Derimod synes undersøgelserne at tyde paa, at syntetisk gær indeholder mindre B_I-vitamin end samme slags gær dyrket i ølurt.

Hvor meget dette drejer sig om, skal vises af de følgende beregninger, hvoraf resultatet dog kun maa betragtes som et skøn. Syntetisk undergær med 93,8 % tørstof givet i daglig dosis paa 0,25 g foranlediger en 5 ugers vægtstigning paa 104 g hos en 3 ugers B_I-vitaminfri rotte. Heraf faar vi $\log x = 0,128 + 0,0085$ ($104 \div 60$) $\pm 0,24$ og følgelig indeholder 1 g syntetisk undergær 13,5 (7,8—23,5) internationale B_I-vitaminenheder pr. g tørstof.

Vi har altsaa set, at en undergærstamme (nr. 113) — omend langsomt — formaar at vokse i et B-vitaminfrit substrat og derved selv syntetisere saavel B_I- som B_{II}-vitamin. Undersøgelserne taler for, at B_{II}-vitaminet dannes i lige saa stor mængde, som naar gæren vokser i ølurt, medens den syntetiske gærs B_I-vitaminindhold er lavere end den tekniske gærs, skønsmæssigt liggende ved en trediedel.

8. *Indhold af B_I og B_{II}-vitamin i syntetisk gær efter videre- dyrkning i ølurt.*

Som tidligere nævnt har vi dyrket undergær (nr. 113) i ølurt, efter at denne i 1½ aar har vokset i Readers medium.

En portion af denne gær fremskaffet og behandlet paa tid-

ligere beskrevne maade undersøges nu for B_I- og B_{II}-vitaminindhold.

Resultatet ses af nedenstaaende tabel; kurverne findes paa tavle LX.

TABEL 20.

Unergær (94 % tørstof)

B_I-vitaminindhold:

	0,04 g	Begyndelsesvægt	5 ugers vægt	5 ugers vægtforøgelse
Dyr nr. 1022		25 g	107 g	82 g
» » 1023		26 »	99 »	73 »
» » 1024		34 »	122 »	88 »
» » 1025		31 »	96 »	65 »
» » 1026		29 »	102 »	73 »
gennemsnitlig vægtforøgelse i 5 uger: 76,2 g.				

B_{II}-vitaminindhold:

	0,2 g	Begyndelsesvægt	7 ugers vægt	7 ugers vægtforøgelse
Dyr nr. 1027		23 g	81 g	58 g
» » 1028		22 »	79 »	57 »
» » 1029		24 »	88 »	64 »
» » 1030		23 »	87 »	64 »
» » 1031		28 »	72 »	44 »
gennemsnitlig vægtforøgelse i 7 uger: 57,4 g.				

Herved finder vi paa sædvanlig maade, at 1 g undergær indeholder 48,8 (37,9—62,9) international B_I-vitaminenhed og 4,8 (3,5—5,8) af vore B_{II}-vitaminenheder pr. g tørstof, hvilket sammenlignet med værdierne for den tekniske bryggeriundergær af samme stamme viser, at denne sidste indeholder lidt mindre B_I-vitamin (ca. 25 %) og en del mere B_{II}-vitamin (ca. 45 %). Da denne forskel ligger udenfor vore beregnede yderværdier, kan den ikke anses for tilfældig, men maa antagelig skyldes de ændringer, vor gærstamme undergaar i den lange tid, i hvilken den er dyrket i Readers medium.

9. Indhold af B_I- og B_{II}-vitamin i Readers substrat efter dyrkning af gær i dette.

Readerssubstrat, hvori undergær nr. 113 har været dyrket i 1 uge, behandles paa tidligere beskrevne maade og doseres derefter ad libitum til rotter paa B_{II}- og B_I-vitaminfri kost.

Resultatet ses af tavle LXI, der viser, at det ikke er muligt at paavise spor af B_I - eller B_{II} -vitamin i de doser af koncentreret Readersubstrat, som dyrene fortærer; det drejer sig om henholdsvis 2,5—0,5 cm³ og 3—0,2 cm³ daglig for B_I - og B_{II} -mangel-dyrenes vedkommende.

Gæren synes saaledes ikke at udskille maaelige B-vitamin-mængder i den uge, væksten er foregaaet.

10. *Indhold af B_I - og B_{II} -vitamin i ølurt før og efter anvendelse til gær dyrkning.*

Efter paabegyndelse af disse forsøg med tillæg af ølurt til B-vitaminfri kost blev man hurtig klar over, at ølurt ikke indeholder tilstrækkelig B-vitamin til at bibringe dyrene en antagelig vægtforøgelse, selv om det tilbydes dyrene ad libitum, hvorved det viser sig, at dyrene spiser fra 5—20 cm³ daglig.

Derfor koncentrerer urten paa tidligere beskrevne maade, hvorefter den doseres. Den valgte dosis er saavel ved forsøg paa B_I - som paa B_{II} -bestemmelserne 5 cm³ inddampet ølurt, men det viser sig snart, at man ikke med nogen sandsynlighed vil kunne formaa et større antal dyr til daglig og regelmæssigt at indtage dette kvantum. At vælge en mindre dosis kan ikke nytte, da dyrenes vægtforøgelse derved vil blive for ringe til anvendelse ved kvantitativ bestemmelse efter vor metode. Vi har uden held forsøgt med et ret stort antal dyr — ialt 25 — for om muligt at faa samlet et tilstrækkeligt antal til, at en blot nogenlunde bedømmelse kunde foretages. Det er imidlertid kun lykkedes os at skaffe ialt 6 dadelfri dyr; af disse viser 3 B_{II} -vitaminindholdet i frisk ølurt og de andre 3 B_I -vitaminindholdet i brugt ølurt. Derimod kan ingen af dyrene, der faar frisk ølurt som B_I -kilde eller brugt ølurt som B_{II} -kilde, anvendes, da ingen af disse regelmæssigt har spist deres ølurt.

Her kunde maaske den tidligere skitserede udvej, hvor teststoffet doseres i smaa mængder som tillæg til en kendt subsufficient B-vitaminsdosis, med held have været benyttet. Dette har imidlertid paa grund af den efterhaanden opstaaede nødvendighed af at udvise sparsommelighed med forbrug af dyr ikke været forsøgt.

Saavel frisk som brugt ølurt indeholder dog baade B_I- og B_{II}-vitamin. Vi har derimod ikke været i stand til at opgøre, om gæren, naar den dyrkes i B-vitaminholdige væsker, tillige — foruden ved syntetisering — skaffer sig vitaminindhold ved ad- eller absorption. For B_{II}-vitaminets vedkommende er dette imidlertid lidet sandsynligt, da syntetisk gær skønsmæssigt indeholder samme B_{II}-vitaminmængde som gær dyrket i ølurt.

VII. Kapitel.

FORSKELLIGE IAGTTAGELSER VEDRØRENDE FOREKOMSTEN AF ROTTEPOLYNEURITIS (BERI-BERI) OG ROTTEDERMATITIS (PELLAGRA) I VORT MATERIALE.

1. *Indledning.*

Gennem talrige arbejder er det i tidens løb sandsynliggjort, at B-vitaminskomplekset udøver en betydelig indflydelse paa stofskiftet hos forskellige forsøgsdyr, idet saavel kulhydrat-, fedt-, protein-, salt- samt vandstofskiftet synes at kunne paavirkes af denne vitamingruppe.

Angaaende literaturen, der knytter sig til disse problemer samt B-vitaminernes relation — specielt til musenes ernæring — henvises til Vogt-Møllers disputats. I vor indledning findes omtalt den literatur, der angiver, hvor hyppigt man ser rotteberi-beri og rottepellagra opstaa.

Vi skal blot her erindre om, at angivelserne er meget vekslende; dog synes der efterhaanden, naar rotten anvendes som forsøgsdyr, at være enighed om, at begge ovennævnte tilstande mest karakteristisk og mest konstant fremkaldes, hvis kosten indeholder betydeligt under sufficient mængde af den paagældende vitaminfraktion.

2. *Literatur angaaende uspecifike dermatiter.*

Boas beskriver 1924 en lidelse, der opstaar hos unge rotter, som faar 20% tørret kinesisk æggehvite som proteinkilde i en iøvrigt med hensyn til andre bestanddele sufficient kost. (Æggehviten var opløst i vand og koaguleret ved kogning). 4—6 uger efter forsøgets begyndelse optræder hos rotterne haaraffald og blefaritis, der indtræder vækststandsning, senere vægtfald og

død. Serumalbumin, spinat og mælk helbreder denne lidelse. Anvendes i stedet for kinesisk æggehvide 20 % frisk hønseæggehvide (ligeledes koaguleret ved kogning), vokser rotterne normalt; dette er tidligere vist af Osborne og Mendel (1913) og Bond (1922). I et senere arbejde fra 1927 uddyber forfatteren sine erfaringer og finder, at gær, rensed kasein og frisk æggehvide indeholder en saakaldt »X-faktor«, som helbreder dette »æggehvidesyndrom«.

Dette bekræftes 1929 gennem undersøgelser foretaget af Findlay og Stern.

1931 viser Boas Fixsen, at det er muligt af tørret æggehvide at fremstille en proteinfraktion, som har fuld næringsværdi, men er uden toksisk virkning. Renset ovalbumin, ovoglobulin og ovomucid er tilfredsstillende proteiner for unge rotter, og tør-ring af disse forandrer ikke næringsegenskaben, som tørret raa æggehvide. Den tidligere nævnte »X-substans« minder en del om B₁₂-vitamin, men da den findes i rensed kasein, kan der ikke være tale om identitet. Den toksiske substans dannes ved tør-ringen af den del af æggehviden, som ikke tilhører proteinfraktionerne. Den beskyttende substans kan ekstraheres delvis af gær ved kogning med fortyndet eddikesyre, hvorimod tilsvarende be-handling af kasein ikke fjerner den. Forfatteren finder end-videre, at rotter, der lider af denne »æggehvidesygdom«, kan blive spontant reficerede og dermed helbredte.

Flere andre forskere har uafhængigt af hinanden fundet lig-nende tilfælde hos rotter. Saaledes har Friedberger og medarbej-dere i arbejder fra 1926—28 vist, at fodring af unge rotter ude-lukkende med hønseæggehvide fremkalder en lidelse, der ytrer sig ved haaraffald, konjunktivitis, væggtab, stomatitis og priapisme.

Scheunert og medarbejdere bekræfter 1927—28 disse under-søgelser, idet de dog kun formaar at fremkalde disse symptomer, hvis æggehviden gives i raa tilstand, medens kogning af ægge-hviden forhindrer deres optræden.

Stenquist kommer i 1928 til samme resultat.

Parsons beskriver i 1931 en dødeligt forløbende sygdom vi-sende sig ved pellagralignende dermatitis, der opstaar hos unge rotter, der ernæres med en kost med højt æggehvideindhold.

Arbejdet kompletteres med senere undersøgelser publiceret 1933; disse viser, at hos unge rotter, der faar en kost bestaaende af 66 % raa kinesisk æggehvite, 10 % gær, 10 % rørsukker, 10 % hvedekim og 4 % saltblanding, optræder i løbet af 46—60 dage vægttab og dermatitis som regel hurtigst hos handyrene. Saa-danne dermatitiske rotter prøves overfor paavirkning af forskellig slags æggehvite ved erstatning af ovennævnte. Det viser sig, at almindelig frisk hønseæggehvide vedligeholder dermatiten, medens saadan æggehvite mister sin toksicitet, hvis den opvarmes blot 5 minutter til 80° C. Inaktivering af kinesisk æggehvides giftindhold sker paa samme maade, men kræver 1½ times opvarmning. Frisk æggehvite, der først opvarmes og senere tørres, er ej heller toksisk. Sædvanligvis æder dyrene mere og tager paa i vægt, naar dermatiten kureres, men det kan dog lykkes at helbrede dermatitis, uden at vægtforøgelse samtidig indtræder.

Da dermatitis ligeledes kan kureres ved at give gær, æggebomme eller lever i stor mængde, tyder den omtalte lidelse paa et sammespil mellem en vis giftighed og mangel paa en mod denne beskyttende faktor.

I et senere arbejde fra samme aar finder forf., at æggehvite denatureret med alkohol stadig er toksisk, medens peptisk fordøjelse eller mild behandling med 1 n. HCl alene foraarsager tab af giftighed. Ligesom Boas Fixsen finder forf. rensset ovalbumin ugiftigt.

En del arbejder, der omhandler relationen mellem kostens indhold af protein og B-vitaminkompleks, hvoraf flere er i nævnt i Vogt-Møllers disputats, skal her ikke omtales. Derimod skal gennemgaas et par moderne afhandlinger, hvori spørgsmaalet angaaende hyppigheden af rottepellagra (dermatitis *opstaaet paa grund af B₁₂-vitaminmangel*) og kostens indhold af protein behandles.

Sherman og Derbigny finder i 1932 hyppigst rottepellagra opstaa hos dyr, der faar en ringe mængde protein i kosten. Ved hjælp af 2 grupper rotter med henholdsvis manglende eller subsufficient B₁₂-vitamintilskud, hvor disse atter er delt i 3 undergrupper med henholdsvis 6, 12 og 18 % kasein i kosten, vises, at hudsymptomer optræder hyppigst og kraftigst ved samtidig lavt B₁₂-vitamin- og proteinindhold. Vægtforskellen paa dyrene

findes størst mellem grupperne, der faar 6 og 12 % protein. Dyr, der faar 6 % protein, vokser godt, saasnart der gives rigeligt B₁₂-vitamin, hvilket viser proteinets sufficiens.

Proteinmængdens indflydelse paa B₁₂-vitaminkravet undersøges af Prunty og Roscoe (1933). Der anvendes enten 20 eller 70 % protein (kasein) i kosten, der prøves særskilt overfor B₁ og B₁₂-vitaminekstrakter. Der findes ingen relation mellem proteinindtagelsen og B₁₂-vitaminkravet. Overskud af protein giver nedsat vækst, dog ikke i de første 5 uger af forsøget. Der opstaar dermatitis hos lige mange rotter i begge grupper, naar B₁₂-vitamin ikke gives. (Grupperne er dog meget smaa, kun 4 i hver gruppe; heraf faar ialt 6 dermatitis). Forff. mener ligeledes at vise, at B₁₂-vitaminet har direkte indflydelse paa væksten uafhængigt af dets virkning paa appetiten; i løbet af en 5 ugers forsøgsperiode spiser dyrene, der faar 70 % protein i kosten, mere end de dyr, der faar 20 % protein, medens vægtforøgelsen er den samme.

Vogt-Møllers forsøg paa mus viser, at dyr, der faar 69 % protein i kosten, kræver mere B₁₂-vitamin tilført, end dyr, der faar 31 % protein i kosten, for at opnaa optimal vækst. 69 % proteinkost med B₁-vitamintillæg foraarsager, at musene dør saa tidligt, at dermatitis ikke udvikles.

En del forskere har fremkaldt rottedermatitis lignende den pellagrøse dermatitis, men aabenbart af en anden natur end de hidtil nævnte.

Saaledes har Burr og Burr 1929 beskrevet en sygdom, der optræder hos rotteunger, der faar en fedtfri, men iøvrigt sufficient kost. Der udvikles en dermatitis paa halen, der bliver inflammeret, svullen, efterhaanden skællende og stiv mest udtalt perifert, hvor nekrose efterhaanden udvikles; endvidere kan bagpoterne blive røde og skællende, og haaraffald kan optræde paa hoved, ryg og hals; ofte ses tillige penisprolaps. Lidelsen begynder omkring halvfjerdsindstyvende—halvfemssindstyvende dag; senere omkring femte maaned kommer der vægttab, og døden indtræder efter yderligere 3—4 maaneder. Gær helbreder ikke denne sygdom, medens dette er tilfældet med fedt. Det synes at være fedtsyrerne, men ikke den forsæbelige fedtfraktion og glycerolet, som har kurativ virkning.

En lignende lidelse, der ligeledes opstaar hos unge rotter, der faar en kost med lavt fedtindhold, er 1933 beskrevet af Graham og Griffith.

Endelig skal nævnes, at det er lykkedes Stockmann og Johnston (1933) paa kaniner, aber, marsvin og frøer ved hjælp af majs-kost pr. os eller kornsor-tekstrakter pr. inject. at give disse dyr en bestemt syre, som skal findes i forskellige kornsorter, dog særlig rigeligt i majs; herved fremkaldes en sygdom med nerve-symptomer og patologisk-anatomiske forandringer i nerve-systemet, der synes identiske med de symptomer, man finder hos pellagrapatienter. Forff. mener, at hudsymptomerne ved pellagra skyldes trofoneurotiske forstyrrelser, og at sygdommen kan undgaas, hvis man undlader at spise giftige kornsorter som majs.

1932 har Kollath eksperimentelt vist, at pellagrasymptomer kun kan fremkaldes, hvis der findes magnium i kosten. Majsstivelse indeholder langt mere MgO end hvede-, ris- og kartoffelstivelse, hvilket sættes i relation til sygdommens fortrinsvise optræden i majsdistrikter.

Til slut skal opmærksomheden henledes paa, at György 1931 meddeler at have paavist tilstedeværelsen af en vandopløselig gærfaktor, kaldet H-vitamin og at mangel paa denne foraarsager opstaaelsen af en seborrhoisk hudlidelse hos rotter, naar kosten er rig paa fedt. Tillæg af andre kendte vitaminer helbreder ikke denne lidelse.

Vogt-Møller har ligeledes paa en stærkt fedtrig kost ved samtidig subsufficient B₁₂-vitaminmængde vist, at forsøgsdyrenes pels faar et fedtet udseende.

3. *Egne tilfælde af rotteberi-beri.*

A. *Symptomer.*

Appetitnedsættelse og nedsat vægtforøgelse eventuelt vægt-aftagen ses konstant som et tidligt tegn paa relativ eller absolut B₁-vitaminmangel. Der optræder altid strittende, pjasket pels, hvis kun lidt eller intet B₁-vitamin tilføres dyrene. Det næste symptom, der meget hyppigt indtræder, er den i literaturen ofte beskrevne »høje gang«. Den viser sig ved, at dyrene i stedet for som under normale forhold at hvile med hele foden — ogsaa hælp-artiet — mod underlaget gaar helt oppe paa spidsen af bag-

poternes tær; samtidig krummes columna stærkt. Som regel gaar dyrene paa dette tidspunkt endnu ganske sikkert.

Hvis Br-vitaminmanglen stadig fortsættes, dør en del af dyrene uden at andre symptomer indtræder. Til sidst bliver de dog saa sløje, at de ligger ned i buret; meget hyppigt optræder kramper umiddelbart før dødens indtræden; disse er ganske uspecifike — optræder f. eks. ligesaavel i agonen hos rotter paa inanition — og medregnes ikke til beri-berikramperne.

Hos en del dyr optræder derimod de typiske beri-beri kramper og lammelser i en periode af kortere eller længere varighed, oftest forudgaaet af et stadium med spastisk, ataktisk gang. Hos alle dyr, der faar lammelser, kan kramper ogsaa fremkaldes; det omvendte er derimod langt fra tilfældet. Lammelserne opstaar oftest i bagbenene, som spredes ud til siden, og hyppigst er de dobbeltsidige. Maaske drejer det sig ikke om en adduktoreparese, men derimod om en tonisk abduktorspasme. De veksler meget i styrke og er meget ustadige, idet de ofte kun indtræder, naar dyret kommer i affekt, hvilket ofte sker, hvis man tager det med haanden.

Denne vekslen er endnu mere udtalt for krampernes vedkommende: disse fremkaldes ofte let, hvis de ikke allerede viser sig, naar rotten tages ud af buret, naar rotten holdes i halen og drejes nogle gange. Der indtræder i saa fald typiske, kloniske kramper.

Disse lammelser og kramper, der er typiske for rotteberi-beri, og hvis tilstedeværelse maa kræves for at kunne stille denne diagnose, kan holde sig i længere tid, navnlig hvis kosten indeholder minimale mængder af Br-vitamin.

B. Hyppighed.

Vi skal nu se, hvor hyppigt vi træffer typisk rotteberi-beri i vort materiale.

Alle vægtskurver for dyr, der har været underkastet fuldstændig eller rimelig partiel Br-vitaminmangel, er gennemgaaet i saa henseende, idet alt, hvad der er hændt af bemærkelsesværdigt under forsøgene, er opnoteret paa vægtskurverne.

Af 129 rotteunger og 12 voksne rotter, der har faaet absolut Br-fri kost, faar henholdsvis 30 og 9 fuldt udviklet beri-beri. Hos

104 rotteunger og 3 voksne rotter, der har faaet betydeligt subsufficiente Br-vitaminsdoser, optræder hos henholdsvis 42 og 2 typisk beri-beri. Dette bekræfter det af mange paa pegede forhold, at rotter lettest faar beri-beri, naar der findes smaa Br-vitaminmængder i kosten.

Af 5 rotter, der har gennemgaaet en periode af relativ Br- + B₁₂-vitaminmangel, faar kun 1 beri-beri.

Blandt de ialt 84 iagttagne tilfælde af beri-beri har lammelser været konstateret hos de 47, medens alle har haft kræmper. Ialt har 253 rotter været udsat for absolut eller relativ Br-vitaminmangel; heraf har 200 udvist symptomet »den høje gang« og 20 har haft priapisme. Disse 2 symptomer er uspecifikke ved B-vitaminmangel og maa betragtes som inanitionssymptomer, idet henholdsvis 18 og 2 af 24 rotter, som er holdt paa stærkt indskrænket kostmængde (1—4 g daglig) med rigelig vitamin-tilførsel, viser »høj gang« og priapisme. Ingen af disse faar derimod typiske beri-beri kræmper, men agonale kræmper er konstateret hos 3.

4. *Egne tilfælde af rottepellagra.*

A. *Symptomer.*

Unddrages 3—4 uger gamle rotteunger helt eller delvis B₁₂-vitamin i kosten, er initialsymptomerne ganske de samme som ved Br-vitaminmangel, nemlig: formindsket kostindtagelse, aftagende vægtforøgelse eller faldende vægt og pjusket strittende pels. Den »høje gang« ses heller ikke sjældent hos disse dyr. Hvis senere en kraftig dermatitis udvikler sig, sker det gradvis som i følgende beskrivelse.

Efter ca. 10—12 ugers B₁₂-vitaminmangel eller indskrænkning — meget sjældent før — danner der sig lettere skællende partier paa snuden, ved øjenlaagsrandene, paa ørerne eller paa poterne. Skældannelsen bliver kraftigere, og der kommer efterhaanden eksudation, ødem og skorpedannelse de nævnte steder; ikke sjældent tillukkes øjnene helt af skorper. Senere, naar skorperne afstødes, optræder haaraffald de nævnte steder, hvilket, naar det sker circumoculært, kan give dyrene et bebrillet udseende. Den pjuskede pels bliver efterhaanden tynd med enkelte bare pletter eller større bare partier. Halen bliver hyppigt skæl-

dækket, »ringet«. Paa handyr ses meget ofte komplet haaraffald paa scrotum og circumanalt. Som slutstadium opstaar i nogle tilfælde tørt gangræn af tæer og hale; undtagelsesvis kan alle tæerne og størstedelen af halen helt bortgangrænere. Til slut sløjer dyret mere og mere af og dør til sidst, uden at man ser kramper eller lammelser optræde undtagen hos ganske enkelte sub finem.

Hverken ved B_I- eller B_{II}-vitaminmangel har vi nogensinde observeret den i literaturen ofte skildrede irritabilitet, ligesom dermatiten kun sjældent ses paafaldende symmetrisk udviklet hos dyrene.

B. Hyppighed.

I den nedenforstaaende opgørelse over vore tilfælde af rottepellagra er disse inddelt i 3 grupper efter symptomernes styrke: første, anden og tredie grads pellagra.

Til første gruppe hører dyr, der viser lettere grader af skorpedannelse, haaraffald eller begge dele paa snude, poter, hale, truncus, circumoculært eller anogenitalt.

I den anden gruppe inkluderes dyr med stærk skorpedannelse, haaraffald eller begge dele de nævnte steder samt begyndende eller ganske let gangræn.

Tredie grads pellagra har de dyr, der viser udbredte gangrænøse forandringer af tæer, hale eller ører kombineret med de tidligere omtalte forandringer.

For at medtages i vor pellagraoversigt kræver vi, at dyrene skal have været paa — absolut eller relativ — B_{II}-vitaminmangel i over 10 uger.

Vi ser nu, at af 11 rotteunger og 8 voksne rotter, der har været udsat for absolut B_{II}-vitaminmangel, faar henholdsvis 9 og 0 pellagrasymptomer; hvis første grads tilfældene fraregnes, bliver det 7. Af 57 rotteunger, der har faaet betydelig subsufficiente B_{II}-vitamindoser, faar 34 pellagra — fraregnet første grads tilfældene bliver det 22. Subsufficiente B_{II}-vitamindoser synes saaledes ikke at bevirke hyppigere optræden af anden og tredie grads pellagra end absolut B_{II}-vitaminmangel. Vor første gruppe repræsenterer dog meget faa dyr.

Af 4 rotter, der har levet over 10 uger paa saavel relativ B_I-

som B_{II}-vitaminmangel, udviser kun 1 dyr første grads pellagra, ingen anden eller tredie grads.

Ialt har altsaa 80 dyr været paa absolut eller relativ B_{II}-vitaminmangel i over 10 uger; heraf har 15 frembudt symptomer paa første grads, 21 paa anden grads og 8 paa tredie grads pellagra, medens 36 slet ingen symptomer har haft, som kunde tydes som pellagrøse. Desuden har 52 vist typisk »høj gang« og 36 har haft priapisme.

Det er derimod ikke lykkedes os at fremkalde pellagrøs dermatitis hos voksne rotter, hvis vægt bringes til at falde kon-
tinueerligt gennem lang tid ved at fratage dyrene B_{II}-vitamin.

5. *Egne tilfælde af proteindermatitis.*

Vi skal nu kort gennemgaa de tilfælde af dermatitis, der er optraadt, hvor rotterne som tillæg til vor basalkost har faaet en sufficient B_{II}-vitaminmængde samt en af vore tidligere omtalte proteinpræparationer som B_{II}-vitaminkilde.

Disse dermatitistilfælde har været af lignende udseende som de tidligere omtalte pellagrøse dermatiter, der er optraadt ved B_{II}-vitaminmangel. Nogen forskel har det ikke været muligt at paavise.

Ligesom ved pellagradyrene inddeler vi dermatiten efter symptomernes styrke i 3 grader og kræver ligeledes her, at dyrene for at medregnes i vor oversigt skal have faaet ovennævnte kost mindst i 10 uger.

Af saadanne dyr har 6 rotter faaet frisk æggehvide; heraf faar 2 trediegrads dermatitis og 2 anden grads dermatitis. 2 rotter har faaet en 10 % opløsning af tørret kinesisk æggehvide uden at udvikle dermatitis, og endelig har 18 faaet en saadan »æggehvidepræparation«, hvor æggehviden er udkoaguleret og frafiltreret; af disse 18 har 2 faaet anden grads og 2 første grads pellagra.

Enkelte dyr har trods begyndende udmærket vækst faaet forskellige dermatitissymptomer; dette er f. eks. tilfældet med det i femte kapitel omtalte dyr nr. 755, der som tillæg til iøvrigt sufficient kost fik 5 cm³ fæddet og koncentreret »æggehvideopløsning« daglig som B_{II}-vitaminkilde. — Dette er en enorm dosis, idet den i B_{II}-vitaminindhold skulde svare til den mængde, som

50 cm³ frisk hønseæggehvide indeholder —; vi husker, at efter 9 ugers forløb med god vægtforøgelse blev vægtkurven affladet, men allerede inden dette skete, optraadte ringet hale og skorper paa snuden. Denne lidelse bragtes fuldstændig til at svinde i løbet af 2 uger ved tillæg af vort autoklaverede spritgærekstrakt, uden at æggehviden blev fjernet fra kosten.

6. Kurative forsøg.

A. Rotteberi-beri.

Vi har i en lang række tilfælde hos rotter med typiske berisymptomer foretaget kurative forsøg hyppigst med Peters B₁-vitaminekstrakt i doser paa 1 draabe eller mere, men ogsaa en del gange anvendt B₁-vitaminstandarden i doser svarende til enheden og derover.

I enkelte tilfælde, hvor dyrene var fuldstændig moribunde, naar B₁-vitaminet doseredes, har dette svigtet, men i alle andre tilfælde ser man allerede i løbet af faa timer, at der indtræder en betydelig bedring, og dagen efter er kramper og lammelser fuldstændig svundne. Fortsætter man med at give B₁-vitamin, ser man, at dyret tager paa i vægt svarende til den doserede mængde, og alle bisymptomerne forsvinder. Ophører man derimod med B₁-vitaminindgift, kommer kramper og lammelser oftest igen efter forskellig tids forløb.

B. Rottepellagra.

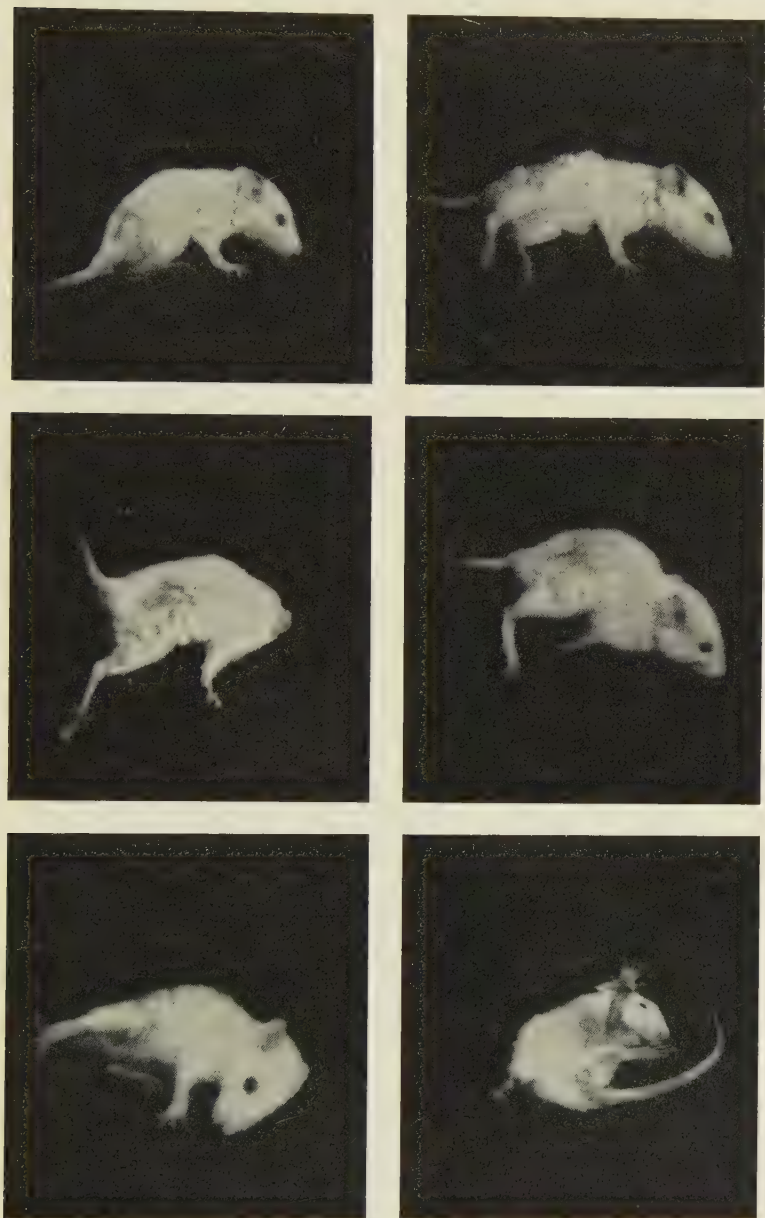
Hertil er hyppigst anvendt vort B₁₂-vitaminekstrakt fremstillet af autoklaveret spritgærekstrakt, og i alle tilfælde, hvor rotterne ikke ved behandlingens begyndelse har været moribunde, har dette ved fortsat dosering bragt dermatitissymptomerne til at svinde i løbet af 2—3 uger og vægten til at stige; samtidig fortager bisymptomerne — priapismen og »den høje gang« — sig fuldstændigt.

Som et kuriosum skal nævnes, at vi hos 2 forskellige rotter har formaaet at helbrede en opstaaet pellagrøs dermatitis fuldstændigt og atter fremkalde denne ved at fratage dyrene B₁₂-vitamin. Til slut er dyrene for anden gang blevet helbredte efter indgift af B₁₂-vitamin.

Et par gange har vi forsøgt at helbrede pellagradermatitis med tillæg af frisk hønseæggehvide i doser paa 5 cm³ om dagen. Dermatiten svinder derved fuldstændigt i løbet af 4 uger, og samtidig stiger vægten betydeligt, ca. 8—9 g om ugen. Vægten bliver imidlertid atter hurtigt stationær, og i løbet af 6—7 uger begynder dermatitis atter at indfinde sig.

Vi har nævnt disse forskellige iagttagelser, fordi de maaske kan have interesse for andre, der arbejder med løsningen af de problemer, der knytter sig hertil. For imidlertid at bidrage væsentligt i nævnte retning maa man kræve mange forsøg udført systematisk med dette for øje; men hensigten med vort arbejde har jo været en ganske anden, og de nævnte tilfælde af dermatitis er kun saadanne, som vi har truffet i vort materiale under gennemprøvning af forskellige B₁₂-vitaminkilder i forskellig mængde.

7. *Illustrationer visende symptomerne ved beri-beri og pellagra hos rotter.*



Billede nr. 1.

Billede nr. 1 viser 6 fotografier af samme rotte optaget med faa sekunders mellemrum for at anskueliggøre forskellige stadier af et beri-berianfald med kramper.



Billede nr. 2.

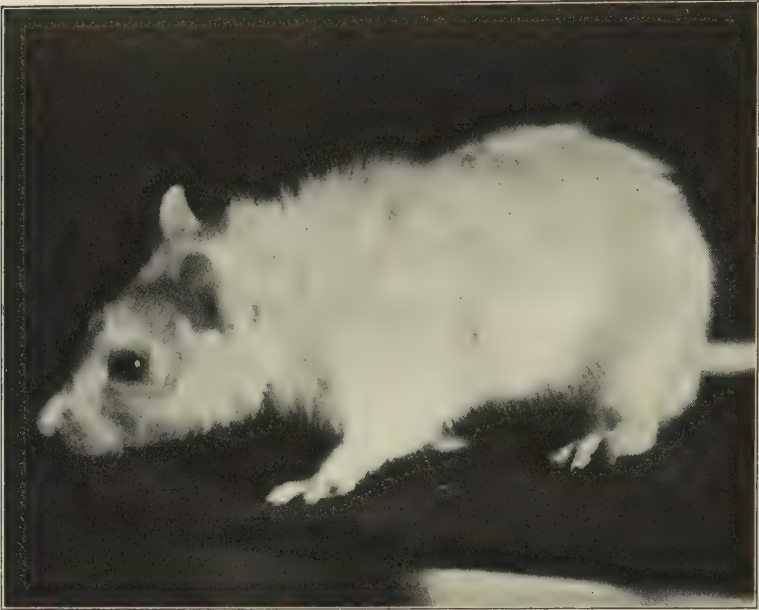


Billede nr. 3.



Billede nr. 4.

Billede nr. 2, 3 og 4 viser pellagrøse snude-, øjen-, pote- og haleforandringer hos samme rotte nr. 638. Rotten har faaet vor basalkost med tillæg af Peters B_I-vitaminekstrakt 1 draabe daglig samt af og til smaa doser af vort B_{II}-vitaminekstrakt.



Billede nr. 5.

Billede nr. 5 viser samme rotte som ovenfor — nr. 638 — fotograferet 4 uger efter, at man er begyndt med indgift af $\frac{1}{2}$ cm³ B₁₂-ekstrakt daglig.



Billede nr. 6.

Billede nr. 6 viser »høj gang« hos en rotte ved B₁₂-vitaminmangel. Denne adskiller sig ikke ved sit udseende fra den »høje gang« ved B₁-vitaminmangel.



Billede nr. 7.



Billede nr. 8.



Billede nr. 9.

Billede nr. 7, 8 og 9 viser en rotte (nr. 669), som i $10\frac{1}{2}$ maaned har været holdt levende paa en B₁₂-vitaminfri, men  ovrigt sufficient kost ved hjälp af smaa B₁₂-vitamintilskud, naar dette skønnedes nødvendigt, uden at faa egentlig pellagra. V egtkurven er ganske vandret — ved forsøgets begyndelse 53 g, efter $10\frac{1}{2}$ maaned 58 g —. Man ser, at haarv æksten er tynd og pjusket, siderne af truncus næsten nøgne; der er betydelig priapisme, men ingen dermatitis.



Billede nr. 10.

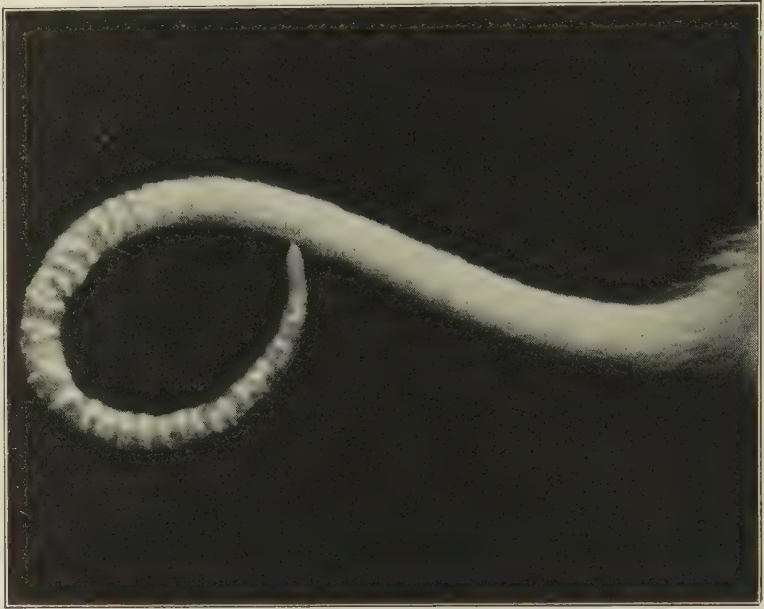


Billede nr. 11.

Billede nr. 10 og 11 viser samme rotte (nr. 669) efter 12 dages tillæg af 1 cm³ B₁₂-ekstrakt daglig. Priapismen nu næsten svundet. (1 uge senere var den helt svundet); kraftig haarvækst saavel paa truncus som paa scrotum.



Billede nr. 12.



Billede nr. 13.

Billede nr. 12 og 13 viser skorpedannelse paa snuden og ringet hale hos tidligere i teksten omtalte dyr (nr. 755), der udviser disse symptomer trods god vækst paa en kost med meget store doser koncentreret, fædlet æggehvideopløsning som B₁₂-vitaminkilde.



Billede nr. 14.

Billede nr. 14 viser 2 hunrotter af samme kuld, hvoraf det store dyr har faaet vor olienormalkost i 9 uger, medens det lille dyr i samme tidsrum har faaet B-vitaminfri grundkost med tillæg af 1 draabe Peters B-eks-trakt daglig, men intet B₁₂-vitamin. Dyrenes vægt efter 9 uger er henholdsvis 137 g og 24 g, medens de begge startede paa 25 g.



Billede nr. 15.



Billede nr. 16.



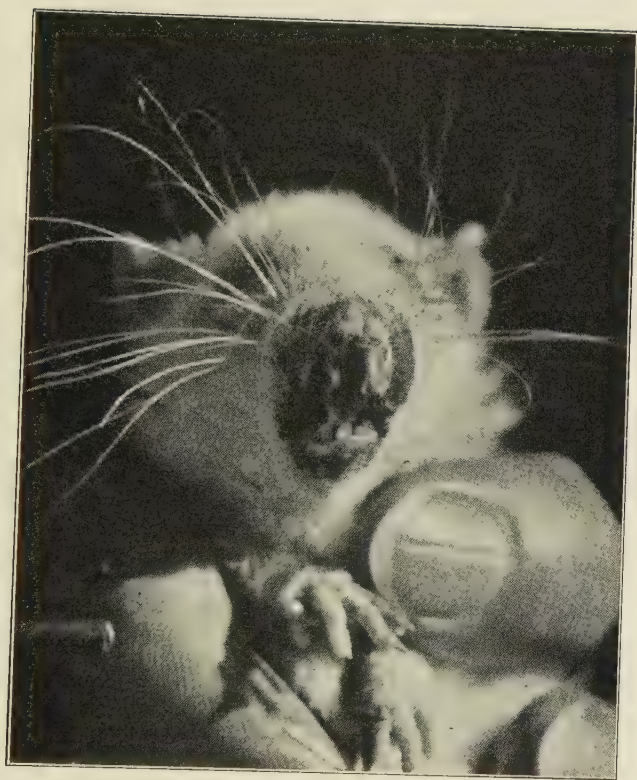
Billede nr. 17.

Billede nr. 15, 16 og 17 viser forskellige stadier af æggehvidedermatitis med øre-, snude- og poteforandringer, endende med komplet gangræn og afstødning af tæerne paa begge bagpoter.



Billede nr. 18.

Billede nr. 18 viser samme rattes bagpote efter $3\frac{1}{2}$ uges tillæg af 1 cm³ B₁₂-vitaminekstrakt daglig. Man ser, at komplet helbredelse er indtraadt; kun mangler tærne fuldstændigt.



Billede nr. 19.



Billede nr. 20.

Billede nr. 19 og 20 viser henholdsvis snudeaffektion og priapisme hos en rotte, der har faaet 5 cm³ frisk hønseæggehvide daglig som B₁₂-vita-
minkilde til iøvrigt sufficient kost.

8. *Refektionens hyppighed og fordeling i vort materiale.*

Ialt har vi iagttaget 50 tilfælde af refektion blandt de rotter, der har været anvendt til vore forsøg. Iberegnet en del rotter, som er medgaaet til enkelte forsøgsrækker, der ikke er medtaget i denne afhandling, drejer det sig om ca. 1000 dyr. Vi ser altsaa i et meget inhomogent materiale som vort, omtalte fænomen opstaa hos ca. 5 % af dyrene.

Da vore dyreforsøg har strakt sig jævnt fordelt over en periode paa knapt 3 aar, kan der maaske være nogen mening i at undersøge, om refektionens hyppighed synes at staa i relation til aarstiden.

Inddelt saaledes viser vort materiale, at fra I/XII—I/III opstaar 19 tilfælde, fra I/III—I/VI: 24, fra I/VI—I/IX: 5 og fra I/IX—I/XII: 2 tilfælde af refektion. Refektionen viser saaledes en tydelig tilbøjelighed til fortrinsvis at optræde i vinter- og foraarssmaanederne, medens vi sjældent træffer den om sommeren eller om efteraaaret.

Ser vi dernæst paa den kost, som dyrene har faaet at spise, er det paafaldende, at trods talrige forsøg med rotter, der i lange perioder kun har faaet B_I-vitamin, men fuldstændig mangler B_{II}-vitamin, er kun 1 tilfælde af refektion optraadt hos et saadant dyr. Derimod konstaterer vi refektion hos 24 rotter, der som tillæg til vor B-vitaminfri basalkost har faaet — oftest rigeligt — tillæg af B_{II}-vitamin; i langt det overvejende antal tilfælde er dette givet som vort B_{II}-vitaminekstrakt, kun enkelte gange som æggehvite.

1 gang optræder refektion hos 1 rotte, der kun faar vor oprindelige »B-vitaminfri« grundkost; denne indeholder jo dog, som vi tidligere har set, lidt B_{II}-vitamin.

Derimod har vi ialt 25 gange set refektionsfænomenet hos rotter, der har faaet saavel B_I- som B_{II}-vitamin samtidig, oftest i større doser; 4 af disse dyr har endog faaet saavel B_I-vitamin — i form af Peters ekstrakt — som B_{II}-vitamin — i form af vort B_{II}-vitaminekstrakt — ad libitum, saaledes at refektionen i disse tilfælde ikke kunde ses ved forandring af vægtskurvens stejlhed, da dyrene allerede voksede maksimalt, men kun kunde konstateres ved iagttagelsen af de voluminøse, hvide fæces, der er typiske for indtraadt refektion.

Af det ovenforstaaende synes saaledes at fremgaa, at refektion lettest opstaar i vinter- og foraarsmaanederne, samt at kostens indhold af B₁₂-vitamin paa en eller anden maade synes at lette opstaaelsen.

RÉSUMÉ

I *indledningen* defineres de opgaver, vi har sat os, nemlig 1) at tilrettelægge og gennemprøve en metode til kvantitative Br- og B_{II}-maalinger og 2) at anvende denne metode til at afgøre, om gær formaa at syntetisere Br- og B_{II}-vitamin.

I *første kapitel* gives en ganske kort oversigt over de vigtigste historiske data indenfor B-vitaminforskningen i almindelighed, som er af væsentlig betydning for vort arbejde. Dernæst gennemgaas noget mere detailleret de i tidens løb foreslaaede og forsøgte metoder til kvantitative B-vitaminanalyser. Disses anvendelighed diskuteres og paa basis heraf udvælges rottevækst-metoden som den prøve, der bedst tilfredsstiller vore krav, nemlig størst mulig nøjagtighed kombineret med en ikke for indviklet teknik.

Det pointeres, at man kun har forsøgt at udarbejde en metode til Br- og B_{II}-vitaminmaalinger, men ikke til undersøgelse af andre mindre vel udforskede faktorer indenfor B-vitaminkomplekset, fordi disse sidstes betydning for menneskets patologi er ganske ukendt.

I *andet kapitel* gennemgaas vor oprindelige teknik og vore forsøg paa at fremstille anvendelige Br- og B_{II}-vitaminkoncentrater.

Paa grundlag af disse undersøgelser anbefales og anvendes følgende kost og vitaminpræparationer: 1) B-vitaminfri grundkost, der bestaar af 20 % rensed kasein, 15 % jordnøddolie, 60 % risstivelse, 5 % salte (Mc Collums saltblanding nr. 185) med tillæg af levertran indeholdende en suffcient mængde A- og D-vitamin. Kaseinet er rensed efter den amerikanske metode angivet af Sherman og medarbejdere. 2) B_{II}-vitaminfri Br-vitaminkilde som et Br-vitaminkoncentrat fremstillet a. m. Kinnersley

og Peters og 3) B_I-vitaminfri B_{II}-vitaminkilde som et autoklavet gærekstrakt angivet af Chick og Roscoe.

Disse ekstrakter sufficente dosis bestemmes, og det vises, at unge rotter, der faar ovennævnte kost med tillæg af de beregnede mængder ekstrakter, vokser normalt og udviser god fertilitet.

I *tredie kapitel* er udarbejdet en række standardvækstkurver dels for en kost med konstant sufficent B_{II}-vitaminmængde med varierende kendte B_I-vitaminmængder, dels for en kost med konstant sufficent B_I-vitaminmængde med varierende kendte B_{II}-vitaminmængder.

Det vises, at vort B_{II}-vitaminekstrakt er holdbart i 1 aar med hensyn til B_{II}-vitaminpotens. 0,2 cm³ af dette vælges som B_{II}-vitaminenhed ved vore undersøgelser, idet den vægtforøgelse, den nævnte mængde forårsager, ligger meget nær ved den, der opnaas ved indgift af 1 international B_I-vitaminenhed og ligeledes paa det nærmeste svarer til begrebet 1 effektiv rottedosis.

Det fremgaar, at 3 ugers rotteunger omend af forskellig vægt bør foretrækkes for 3 og 4 ugers af samme vægt ved B-vitaminundersøgelser, da forskel i alder synes at influere mere paa resultaterne end vægtforskelligheder i 3 ugers alderen.

Til slut gennemgaas, hvilke B-vitaminfaktorer man antagelig vil kunne bestemme ved sammenligning med resultaterne fra vore standardkurver. Det viser sig, at det sandsynligvis er henholdsvis B_I + B_{IV}-vitamin- og B_{II}-vitamin + Y-faktor-bestemmelser, man foretager.

I begyndelsen af *fjerde kapitel* begrundes, at de logaritmiske reaktionskurver maa forventes at være parallelle for de forskellige præparater, og principerne for den statistiske vurdering anføres.

Vurderingen af metodernes fejlgrænser i de 2 eneste fundne arbejder i literaturen, hvor en saadan vurdering er forsøgt, er ikke fyldestgørende. De logaritmiske reaktionskurver samt fejlgrænserne bestemmes saa vidt muligt.

Det konstateres, at for vore egne forsøg er den logaritmiske vægtforøgelseskurve retlinet i det størst mulige interval efter 5 og 7 ugers forløb for henholdsvis B_I- og B_{II}-vitamin; omraaderne er 1/2—4 internationale B_I-vitaminenheder og 1/4—5 af vore

B_{II}-enheder. Metodens fejlgrænser for 1—15 dyr anføres i en tabel.

Vore forsøg antyder, at der bestaar en lineær relation mellem det maksimale ugentlige forbrug af føde og logaritmen til B_I-vitamindoser mellem $\frac{3}{4}$ og 3 internationale enheder.

Til bestemmelse af B_I-vitaminmængden er 5 ugers vægtforøgelsesmetoden den bedste af de her diskutererede metoder; den har det største anvendelsesomraade og de mindste fejlgrænser.

I *femte kapitel* undersøges en række forskellige B_I- og B_{II}-vitaminpræparationers indhold af B_I- og B_{II}-vitamin, og deres anvendelighed som B-vitaminkilder ved B-vitaminanalyser diskuteres.

Sjette kapitel giver som indledning en historisk gennemgang af de vigtigste arbejder, der beskæftiger sig med forskellige forhold af betydning ved gærvækst og undersøgelser over gærs indhold af B-vitamin.

Dernæst leveres en detaljeret redegørelse for vore egne forsøg med dyrkning af en bestemt undergærstamme i en B-vitaminfri mineralsaltsukkeropløsning (Readers substrat) og endelig vises, at nævnte gærstamme dyrket i et saadant substrat formaar at syntetisere saavel B_I- som B_{II}-vitamin.

I *syvende kapitel* gennemgaas — efter en kort indledende oversigt angaaende ikke pellagrøse former af dermatitis hos rotter — de tilfælde af rotteberi-beri, rottepellagra og protein-dermatitis, som vi har set optræde i vort materiale; saavel symptomer som hyppighed angives, og kurative forsøg omtales.

Til slut nævnes, at vi hos ca. 5 % af vore rotter har konstateret fænomenet refektion.

LITERATURFORTEGNELSE

- Acton, H. W., Ghosh, S. og Dutt, A.:* Ind. Journ. Med. Res. 21, 103, 1933.
- Aykroyd, W. R. og Roscoe, M. H.:* Biochem. Journ. 23, 483, 1929.
- Bachmann, F.:* Journ. Biol. Chem. 39, 235, 1919.
- Bechdel, S. J.:* Journ. Biol. Chem. 80, 231, 1928.
- Bing, F. C. og Mendel, L. B.:* Journ. Nutrit. 2, 49, 1929.
- Birch, T. W. og Harris, L. J.:* Biochem. Journ. 28, 602, 1934.
- Block, R. J., Cowgill, G. R. og Klotz, B. H.:* Journ. Biol. Chem. 94, 765, 1931.
- Boas, M. A.:* Biochem. Journ. 18, 422, 1924.
- : Biochem. Journ. 18, 1322, 1924.
- : Biochem. Journ. 21, 712, 1927.
- Boas Fjæsen, M. A.:* Biochem. Journ. 25, 596, 1931.
- Bond, M.:* Biochem. Journ. 16, 479, 1922.
- Bourquin, A.:* Experiments on the quantitative determination of vitamin G. Disputats. New York. 1929.
- Browning, E.:* The Vitamins. London 1931.
- Burr, G. O. og Burr, M. M.:* Journ. Biol. Chem. 82, 345, 1929.
- Carter, C. W.:* Biochem. Journ. 24, 1811, 1930.
- Carter, C. W., Kinnerstey, H. W. og Peters, R. A.:* Biochem. Journ. 24, 1832, 1930.
- Chase, E. F. og Sherman, H. C.:* Journ. Amer. Chem. Soc. 53, 3506, 1931.
- Chick, H. og Copping, A. M.:* Biochem. Journ. 24, 1748, 1930.
- —: Biochem. Journ. 24, 1764, 1930.
- Chick, H. og Hume, E. M.:* Journ. Biol. Chem. 39, 203, 1919.
- Chick, H. og Jackson, H. M.:* Biochem. Journ. 26, 1223, 1932.
- Chick, H. og Roscoe, M. H.:* Biochem. Journ. 21, 698, 1927.
- —: Biochem. Journ. 23, 498, 1929.
- Chittenden, R. H. og Underhill, F. P.:* Amer. Journ. Physiol. 44, 13, 1917.
- Clemmesen, S.:* Acta Pathol. et Microbiol. Scand. 10, 304, 1933.
- Cooper, E. A.:* Journ. Hyg. 12, 436, 1912.
- Coward, K. H., Burn, J. H., Ling, H. W. og Morgan, B. G. E.:* Biochem. Journ. 27, 1719, 1933.
- Deas, J.:* Journ. Biol. Chem. 61, 5, 1924.
- Drummond, J. C.:* Biochem. Journ. 11, 255, 1917.
- Drummond, J. C. og Whitmarsh, J. M.:* Journ. Inst. Brewing 38, 264, 1932.

- Eddy, W. H., Heft, H. L., Stevenson, H. C. og Johnson, R.*: Journ. Biol. Chem. 47, 249, 1921.
- Eddy, W. H., Kerr, R. W. og Williams, R. R.*: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 21, 307, 1924.
- Eijkman, C., Hoogenhuijze, van C. J. C. og Derks, T. J. G.*: Journ. Biol. Chem. 50, 311, 1922.
- Emmett, A. D. og Stockholm, M.*: Journ. Biol. Chem. 43, 287, 1920.
- Euler, H. von og Petterson, A.*: Zeitschr. Physiol. Chem. 114, 4, 1921.
- Evans, H. M. og Burr, G. O.*: Journ. Biol. Chem. 77, 231, 1928.
- Evans, H. M. og Lepkowsky, S.*: Journ. Nutrit. 2, 1, 1929.
- Findlay, G. M.*: Journ. Path. and Bact. 24, 175, 1920.
- : Journ. Path. and Bact. 31, 353, 1928.
- Flemming, W. D.*: Journ. Biol. Chem. 49, 119, 1921.
- Fridericia, L. S., Freudenthal, P., Gudjonsson, S., Johansen, G. og Schoubye, N.*: Hospitalstidende 71, 499, 1928.
- Friedberger, E.*: Deutsch. Med. Wochenschr. 52, 1760, 1926.
- Friedberger, E., Abraham, A. og Seidenberg, S.*: Deutsch. Med. Wochenschr. 54, 2092, 1928.
- Friedberger, E. og Seidenberg, S.*: Deutsch. Med. Wochenschr. 53, 1507, 1927.
- Fulmer, E. J., Duecker, W. W. og Nelson, V. E.*: Journ. Amer. Chem. Soc. 46, 723, 1924.
- Fulmer, E. J. og Nelson, V. E.*: Proc. Iowa Acad. Scienc. 29, 371, 1922.
- cit. efter Tanner, F. W.: Chem. Rev. 1, 397, 1925.
- — : Journ. Infect. Diseas. 33, 130, 1923.
- Fulmer, E. J., Nelson, V. E. og Sherwood, F. F.*: Journ. Amer. Chem. Soc. 43, 186, 1921.
- — —: Journ. Amer. Chem. Soc. 43, 191, 1921.
- Fulmer, E. J., Nelson, V. E. og White, A.*: Journ. Biol. Chem. 57, 397, 1923.
- Funk, C.*: The Vitamines. Baltimore. 1922.
- Funk, C., Caspe, S. og Caspe, H.*: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 28, 816, 1930.
- Funk, C. og Dubin, H. E.*: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 17, 175, 1920.
- —: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 19, 155, 1921.
- —: Journ. Biol. Chem. 48, 437, 1921.
- Gaddum, J. H.*: Med. Research Council. Repts. Biol. Stand. London. 1933.
- Ghosh, S. og Dutt, A.*: Ind. Journ. Med. Res. 20, 863, 1933.
- Goldberger, J. og Tanner, W. F.*: U. S. Pub. Health Repts. 39, 87, 1924.
- —: U. S. Pub. Health Repts. 40, 54, 1925.
- Goldberger, J., Waring, C. H. og Willets, D. G.*: U. S. Pub. Health Repts. 30, 3117, 1915.
- Goldberger, J., Wheeler, G. A., Lillie, R. D. og Rogers, L. M.*: U. S. Pub. Health Repts. 41, 297, 1926.
- Graham, C. E. og Griffith, W. H.*: Journ. Nutrit. 6, 179, 1933.

- Gravilescu, N., Meiklejohn, A. P., Passmore, R. og Peters, R. A.*: Proc. Royal Soc. B. 110, 431, 1932.
- Gudjonsson, S. V.*: Experiments on vitamin A deficiency in rats and the quantitative determination of vitamin A. Disputats. København 1930.
- Guerrant, N. B. og Dutcher, R. A.*: Journ. Biol. Chem. 98, 225, 1932.
- Guha, B. C. og Drummond, J. C.*: Biochem. Journ. 23, 880, 1929.
- György, P.*: Zeitschr. Ärztl. Fortbild. 28, 377, 1931.
- György, P., Kuhn, R. og Wagner-Jauregg, T.*: Klin. Wochenschr. 12, 1241, 1933.
- — —: Die Naturwissensch. 21, 560, 1933.
- — —: Hoppe-Seylers Zeitschr. Physiol. Chem. 223, 21, 1934.
- — —: Hoppe-Seylers Zeitschr. Physiol. Chem. 223, 27, 1934.
- — —: Hoppe-Seylers Zeitschr. Physiol. Chem. 223, 241, 1934.
- György, P., Klaveren van, F. W., Kuhn, R. og Wagner-Jauregg, T.*: Hoppe-Seylers Zeitschr. Physiol. Chem. 223, 236, 1934.
- Harden, A. og Zilva, S. S.*: Biochem. Journ. 15, 438, 1921.
- Hawking, F.*: Biochem. Journ. 21, 728, 1927.
- Heaton, T. B.*: Biochem. Journ. 16, 800, 1922.
- Heller, V. G.*: Journ. Biol. Chem. 55, 385, 1923.
- Hofmeister, F.*: Biochem. Zeitschr. 128, 540, 1922.
- Hunt, C.*: Journ. Biol. Chem. 79, 723, 1928.
- Hunt, C. og Wilder, W.*: Journ. Biol. Chem. 90, 279, 1931.
- Ide, M.*: Journ. Biol. Chem. 46, 521, 1921.
- Jansen, B. C. P. og Donath, W. F.*: Chem. Weekbl. 23, 201, 1926.
- cit. efter Sherman og Smith: The Vitamins.
- Jansen, C. P., Wibaut, J. P., Huberts, P. J. og Wiardi, P. W.*: Recueil des Trav. Chim. Pays-Bas. 52, 366, 1933.
- Jendrassik, A.*: Journ. Biol. Chem. 57, 129, 1923.
- Kennedy, C. og Palmer, L. S.*: Journ. Biol. Chem. 54, 217, 1922.
- —: Journ. Biol. Chem. 76, 607, 1928.
- Kinnersley, H. W., O'Brien, J. R. og Peters, R. A.*: Proc. Physiol. 76, 17P, 1932.
- — —: Biochem. Journ. 27, 232, 1933.
- Kinnersley, H. W. og Peters, R. A.*: Biochem. Journ. 28, 667, 1934.
- Kinnersley, H. W., Peters, R. A. og Reader, V.*: Biochem. Journ. 22, 276, 1928.
- — —: Biochem. Journ. 24, 1820, 1930.
- Kline, O. L., Keenan, J. A., Elvehjem, C. A. og Hart, E. B.*: Journ. Biol. Chem. 99, 295, 1933.
- Kollath, W.*: Arch. Exp. Pathol. and Pharm. 168, 424, 1932.
- Kon, S. K. og Drummond, J. C.*: Biochem. Journ. 21, 632, 1927.
- Kruse, H. D. og McCollum, E. V.*: Physiol. Rev. 9, 126, 1929.
- Kuhn, R., György, P. og Wagner-Jauregg, T.*: Ber. Deutsch. Chem. Gesell. 66, 317, 1933.
- — —: Ber. Deutsch. Chem. Gesell. 66, 1034, 1933.
- Lassen, H. K.*: Acta Pathol. et Microbiol. Scand. 11, 183, 1934.

- Leader, V. R.*: Biochem. Journ. 24, 1172, 1930.
- Levene, P. A. og Hoeven, van der B. J. C.*: Journ. Biol. Chem. 61, 429, 1924.
- Mac Donald, M. B.*: Journ. Biol. Chem. 54, 243, 1922.
- : Journ. Biol. Chem. 56, 489, 1923.
- Mac Donald, M. B. og Mc. Collum, E. V.*: Journ. Biol. Chem. 45, 307, 1921.
- Mc Collum, E. V. og Simmonds, N.*: Journ. Biol. Chem. 33, 55, 1918.
- Medical Research Council*: Vitamins. London. 1932.
- Mitchell, H. H.*: Amer. Journ. Physiol. 104, 594, 1933.
- Narayanan, B. T.*: Biochem. Journ. 24, 6, 1930.
- Narayanan, B. T. og Drummond, J. C.*: Biochem. Journ. 24, 19, 1930.
- Nelson, V. E., Fulmer, E. J. og Cessna, R.*: Journ. Biol. Chem. 46, 77, 1921.
- O'Brien, J. R.*: Biochem. Journ. 28, 926, 1934.
- Osborne, T. B. og Mendel, L. B.*: Journ. Biol. Chem. 15, 311, 1913.
- Page, J. W.*: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 30, 87, 1932.
- Parsons, H. T.*: Journ. Biol. Chem. 90, 351, 1931.
- Parsons, H. T. og Kelly, E.*: Journ. Biol. Chem. 100, 645, 1933.
- —: Amer. Journ. Physiol. 104, 150, 1933.
- Peskett, G. L.*: Biochem. Journ. 18, 866, 1924.
- : Biochem. Journ. 21, 104, 1927.
- : Biochem. Journ. 21, 460, 1927.
- : Biochem. Journ. 21, 1102, 1927.
- : Biol. Rev. 8, 1, 1933.
- Peters, R. A.*: Journ. State Med. 37 og 38. cit. efter Medical Research Council. Vitamins. 1932.
- Peters, R. A., Kinnersley, H. W., Orr-Ewing, J. og Reader, V.*: Biochem. Journ. 22, 445, 1928 .
- Prunty, F. T. og Roscoe, M. H.*: Biochem. Journ. 27, 699, 1933.
- Quinn, E. J., Whalen, J. G. og Hartley, J. G.*: Journ. Nutrit. 3, 257, 1930.
- Randoin, L. og Lecoq, R.*: Compt. Rend. Acad. Scienc. 182, 1408, 1926.
- —: Compt. Rend. Acad. Scienc. 182, 1564, 1926.
- —: Compt. Rend. Soc. Biol. 47, 1928 II.
- Reader, V.*: Biochem. Journ. 21, 901, 1927.
- : Biochem. Journ. 23, 689, 1929.
- : Biochem. Journ. 24, 77, 1930.
- : Biochem. Journ. 24, 1827, 1930.
- Ringsted, A.*: Acta Pathol. et Microbiol. Scand. 11, 197, 1934.
- Roscoe, M. H.*: Biochem. Journ. 25, 2056, 1931.
- : Biochem. Journ. 27, 1533, 1933.
- : Biochem. Journ. 27, 1537, 1933.
- Robertson, R. C.*: Journ. Infect. Diseas. 35, 311, 1924.
- : Journ. Infect. Diseas. 35, 395, 1924.
- Robertson, R. C. og Davis, D. J.*: Journ. Infect. Diseas. 32, 153, 1923.
- Salmon, W. D., Guerrant, N. B. og Hays, J. M.*: Journ. Biol. Chem. 76, 487, 1928.

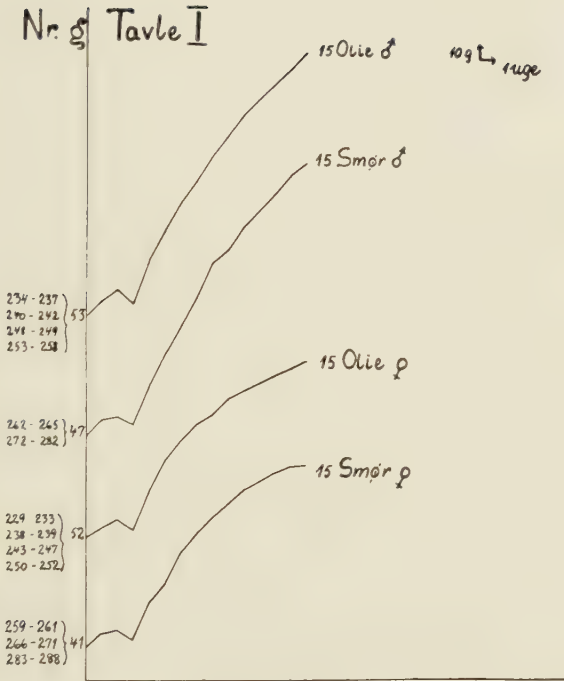
- Sandels, M. R.*: Journ. Nutrit. 2, 409, 1929.
- Scheunert, A.* og *Schieblich, M.*: Biochem. Zeitschr. 184, 58, 1927.
- —: Biochem. Zeitschr. 212, 80, 1929.
- Scheunert, A.*, *Schieblich, M.* og *Wagner, E.*: Deutsch. Med. Wochenschr. 54, 689, 1928.
- Scheunert, A.* og *Wagner, E.*: Deutsch. Med. Wochenschr. 53, 1258, 1927.
- Schieblich, M.*: Biochem. Zeitschr. 207, 458, 1929.
- Seidell, A.*: Journ. Biol. Chem. 67, 593, 1926.
- Sherman, H. C.* og *Axtmayer, J. H.*: Journ. Biol. Chem. 75, 207, 1927.
- Sherman, H. C.* og *Derbigny, J. A.*: Journ. Biol. Chem. 99, 165, 1932.
- Sherman, H. C.* og *Mac Arthur, E. H.*: Journ. Biol. Chem. 74, 107, 1927.
- Sherman, H. C.* og *Sandels, M. R.*: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 26, 536, 1929.
- —: Journ. Nutrit. 3, 395, 1930.
- Sherman, H. C.* og *Smith, S. L.*: The Vitamins, 2 Edition. New York. 1931.
- Sherman, H. C.* og *Spohn, A.*: Journ. Biol. Chem. 45, 271, 1923.
- Simonnet, H.*: Compt. Rend. Soc. Biol. 83, 1508, 1920.
- Smith, M. J.*: U. S. Pub. Health Repts. 45, 116, 1930.
- Smith, M. J.* og *Hendrick, E. G.*: U. S. Pub. Health Repts. 41, 201, 1926.
- Souza, G. de P.* og *Mc Collum, E. V.*: Journ. Biol. Chem. 44, 113, 1920.
- Spruyt*: Meded. van d. Dienst der Volks. Nederl. Ind. 19, 45, 1930. Cit. efter Ind. Journ. Med. Res. 20, 863, 1933.
- Steenboch, H.*, *Sell, M. F.* og *Nelson, E. M.*: Journ. Biol. Chem. 55, 390, 1923.
- Stenqvist, F.*: Deutsch. Med. Wochenschr. 54, 1920, 1928.
- Stockman, R.* og *Johnston, J. M.*: Journ. Hyg. 33, 204, 1933.
- Sunderlin, G.* og *Werkmann, H. C.*: Journ. Bact. 16, 1928.
- Swoboda, F.*: Journ. Biol. Chem. 44, 531, 1920.
- Tanner, F. W.*: Chem. Rev. 1, 397, 1925.
- Trevan, J. W.*: Proc. Roy. Soc. 101, 483, 1927.
- Vedder, E. B.* og *Clark, E.*: Phillipine Journ. Scienc. 7, 423, 1912. Cit. efter Sherman og Smith: The Vitamins.
- Vogt-Møller, P.*: Relationen mellem B-vitaminerne og Ernæringens Indhold af Protein, Fedt og Kulhydrat. Disputats. København 1934.
- Wallace, G. J.* og *Tanner, F. W.*: Zentralbl. f. Bakt. 76, 1, 1928.
- Willaman, J. J.* og *Olsen, A. G.*: Journ. Biol. Chem. 55, 815, 1923.
- Williams, G. Z.* og *Lewis, R. C.*: Journ. Biol. Chem. 89, 275, 1930.
- Williams, R. J.*: Journ. Biol. Chem. 38, 465, 1919.
- : Journ. Biol. Chem. 42, 259, 1920.
- Williams, R. J.* og *Bradway, E. M.*: Journ. Amer. Chem. Soc. 53, 783, 1931.
- Williams, R. R.* og *Seidell, A.*: Journ. Biol. Chem. 26, 431, 1916.
- Williams, R. R.* og *Waterman, R. E.*: Journ. Biol. Chem. 78, 311, 1928.
- Williams, R. R.*, *Waterman, R. E.* og *Gurin, S.*: Journ. Biol. Chem. 83, 321, 1929.

Windaus, A., Tschesche, R., Rukopf, H., Laquer, F. og Schultz, F.: Nachricht. Gesell. Wissensch. Göttingen 1931. Cit. efter Nutrit. Abstr. Rev. 1, 1932.

T A V L E R

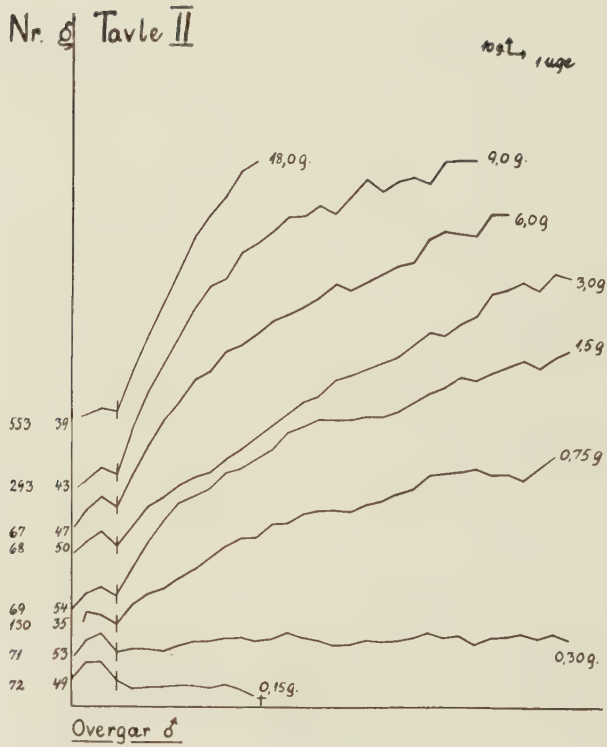
TIL

»UNDERSØGELSER OVER B-VITAMINMAALINGER
— SPECIELT I GÆR — VED HJÆLP AF
ROTTEVÆKSTMETODEN«.



TAVLE I

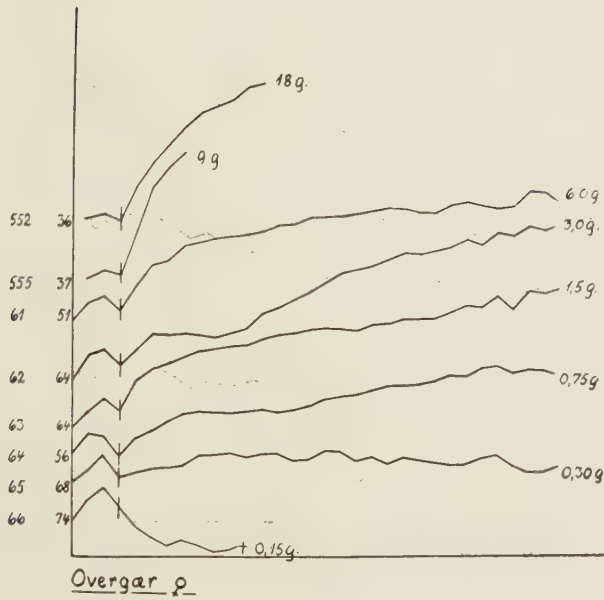
viser væggtkurverne for ialt 60 4-ugers rotteunger — 30 hanner og 30 hunner — der faar smørnormalkost eller jordnøddolienormalkost + tran, forudgaaet af en 3 ugers B-vitaminfri forperiode.



TAVLE II

viser vægtskurverne for 8 4-ugers hanrotter, der faar vor oprindelige jordnødbolbasalkost + tran, efter 3 ugers forløb med tillæg af forskellige doser tørret, autolyseret overgær. (Dosis angivet pr. uge).

Nr. 5 Tavle III

103¹, 1 uge

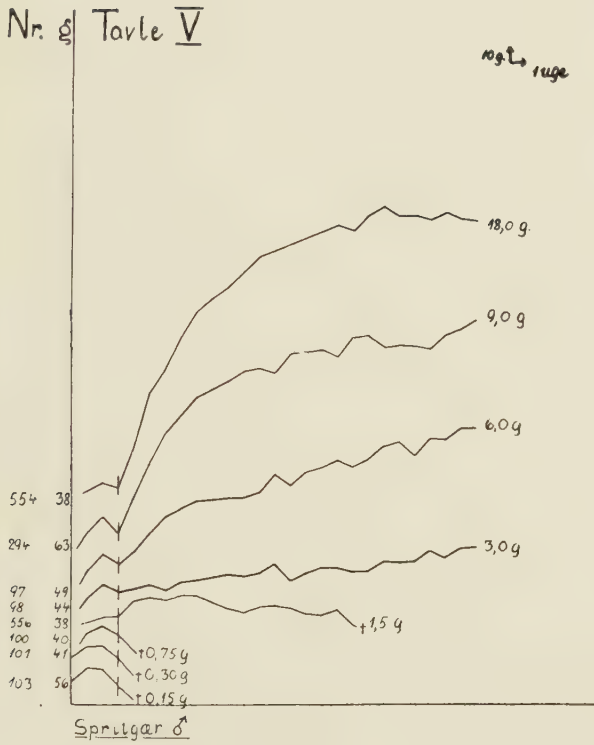
TAVLE III

viser vægtekurverne for 8 4-ugers hunrotter, der faar vor oprindelige jord-nødoliebasalkost + tran, efter 3 ugers forløb med tillæg af forskellige doser tørret, autolyseret overgær. (Dosis angivet pr. uge).



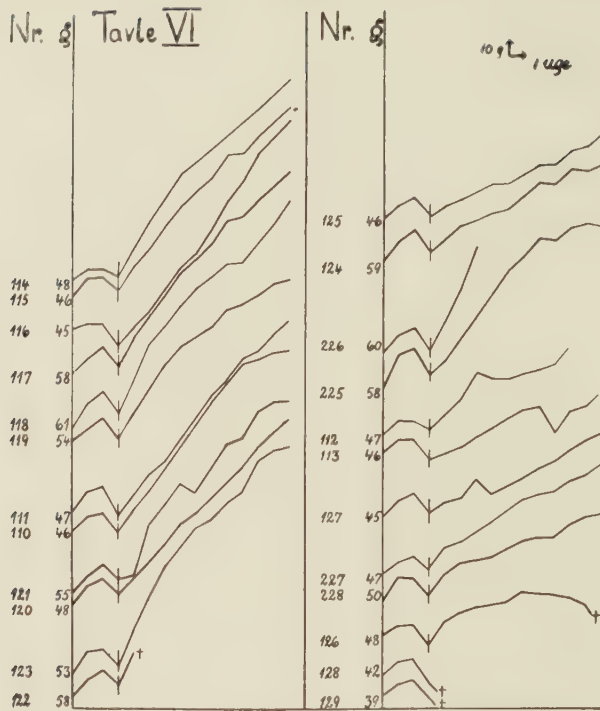
TAVLE IV

viser vægtkurverne for 8 4-ugers hanrotter, der faar vor oprindelige jordnøddoliebasalkost + tran, efter 3 ugers forløb med tillæg af forskellige doser tørret, autolyseret undergær. (Dosis angivet pr. uge).



TAVLE V

viser vægtkurverne for 8 4-ugers hanrotter, der faar vor oprindelige jord-nødoliebasalkost + tran, efter 3 ugers forløb med tillæg af forskellige doser tørret, autolyseret spritgær. (Dosis angivet pr. uge).



TAVLE VI

viser vægtkurverne for 4-ugers hanrotter, der faar vor oprindelige jord-nødoliebaskost + tran, efter 3 ugers forløb med tillæg af forskellige doser af gærfraktioner fremstillet a. m. Williams og Lewis.

Nr. 122—123 faar helgærekstrakt 8 cm³ og gærrest 4 g 3 × ugentl.

» 120—121 » » 4 » » 2 g 3 × »

» 110—111 » » 4 » » 3 × »

» 118—119 » »BII«-ekstr. 2 cm³, fullerjord »BI« 0,4 g og gærrest 2 g 3 × ugentl.

» 116—117 » » 4 cm³ og fullerjord »BI« 0,8 g 3 × ugentl.

» 114—115 » » 2 cm³ » » »BI« 0,4 g 3 × ugentl.

» 128—129 » kolloidopslemning 2 cm³ 3 × »

» 126 » fullerjord »BI« 0,4 g 3 × »

» 227—228 » » 0,8 g 3 × »

» 127 » » 0,4 g og gærrest 2 g 3 × »

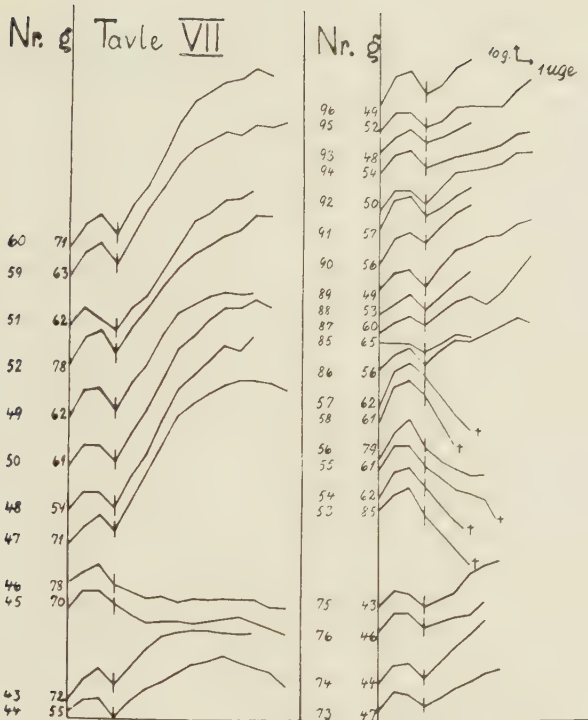
» 112—113 » »BII«-ekstr. 2 cm³ 3 × ugentl.

» 225—226 » » 4 cm³ 3 × »

» 124—125 » gærrest 2 g 3 × »

» 122 dør ved et ulykkestilfælde.

» 112 og 226 udgaar paa grund af refektion.



TAVLE VII

viser vægtskurverne for 4-ugers hanrotter, der faar vor oprindelige jord-nødoliebalsalkost + tran, efter 3 ugers forløb med tillæg af forskellige doser af gærfraktioner fremstillet a. m. Hunt og Wilder.

Nr. 43—44 faar A-ekstrakt 2 cm³ 3 × ugentl.

» 73—74 » » 4 cm³ 3 × »

» 45—46 » B-ekstrakt 2 cm³ 3 × »

» 75—76 » » 4 cm³ 3 × »

» 47—48 » A-ekstr. 2 cm³ og B-ekstr. 2 cm³ 3 × ugentl.

» 49—50 » » 2 cm³ » » 2 cm³ + gærrest 0,76 g
3 × ugentl.

» 51—52 » » 2 cm³ » » 2 cm³ + fullerjordrest 1,1 g
3 × ugentl.

» 59—60 » » 2 cm³ » » 2 cm³ + gærrest 0,76 g og
fullerjordrest 1,1 g 3 × ugentl.

» 53—54 » gærrest 0,76 g 3 × ugentl.

» 55—56 » fullerjordrest 1,1 g 3 × ugentl.

» 57—58 » gærrest 0,76 g og fullerjordrest 1,1 g 3 × ugentl.

» 85—86 » A-ekstr. 2 cm³ + gærrest 0,76 g + fullerjordrest 1,1 g
3 × ugentl.

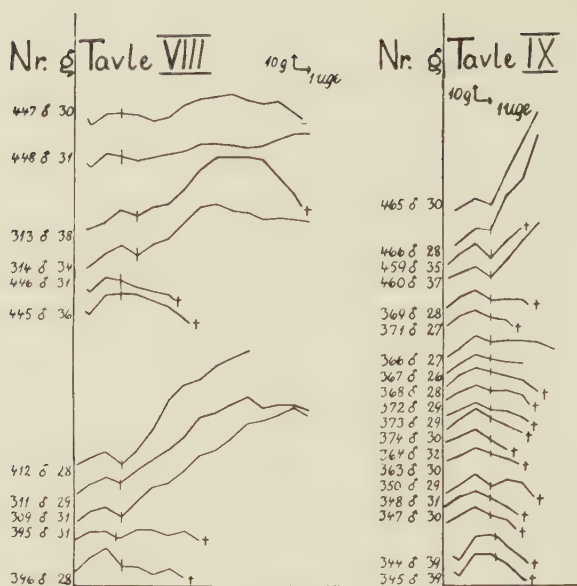
» 87—88 » B-ekstr. 2 cm³ + gærrest 0,76 g + fullerjordrest 1,1 g
3 × ugentl.

» 89—90 » A-ekstr. 2 cm³ + gærrest 0,76 g 3 × ugentl.

» 91—92 » A-ekstr. 2 cm³ + fullerjordrest 1,1 g 3 × ugentl.

» 93—94 » B-ekstr. 2 cm³ + gærrest 0,76 g 3 × »

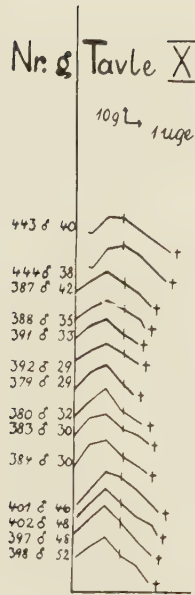
» 95—96 » B-ekstr. 2 cm³ + fullerjordrest 1,1 g 3 × »



TAVLE VIII og IX

viser vægtkurverne for 3-ugers hanrotter, der faar vor oprindelige jord-nødoliebasalkost + tran, efter 3 ugers forløb med tillæg af autoklaveret gærekstrakt (forskellig slags, forskelligt behandlet og i forskellig mængde).

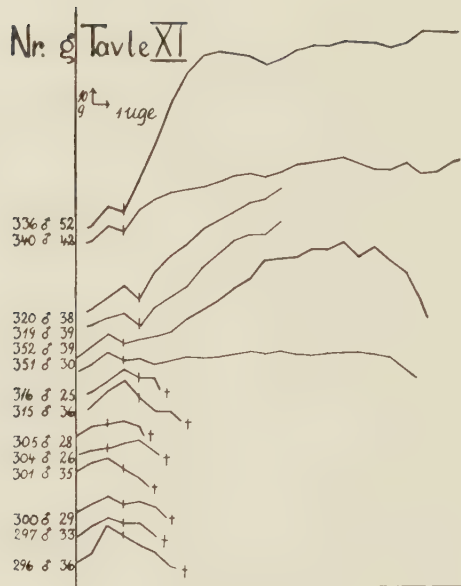
Nr. 395 og 396	faar 0,75 cm ³ 3 × ugentl.	Bryggeriovergærekstrakt (1 cm ³ = 2 g tørtgær) autoklaveret 5 t. ved 1 atmosf.
» 309 og 311	» 1,50 cm ³ 3 × »	
» 412	» 3,00 cm ³ 3 × »	
» 445 og 446	» 0,75 cm ³ 3 × »	do. autoklaveret 5 t. ved 1½ atmosf.
» 313 og 314	» 1,50 cm ³ 3 × »	
» 447 og 448	» 3,00 cm ³ 3 × »	
» 344, 345 og 347	» 1,50 cm ³ 3 × »	Bagerigærekstrakt (1 cm ³ = 2 g tørtgær) autoklaveret 5 t. ved 1½ atmosf.
» 348 og 350	» 3,00 cm ³ 3 × »	
» 363 og 364	» 6,00 cm ³ 3 × »	
» 372, 373 og 374	» 1,50 cm ³ 3 × »	do. autoklaveret 5 t. ved 1 atmosf.
» 366, 367 og 368	» 3,00 cm ³ 3 × »	
» 369 og 371	» 6,00 cm ³ 3 × »	
» 459 og 460	» 1,50 cm ³ 3 × »	do. autoklaveret 1 t. ved 1 atmosf.
» 465 og 466	» 3,00 cm ³ 3 × »	



TAVLE X

viser vægtkurverne for 3-ugers hanrotter, der faar vor oprindelige jord-nødoliebasalkost + tran, efter 3 ugers forløb med tillæg af forskellige æggehvidepræparationer.

Nr. 397 og 398	faar	5 cm ³	dagl. frisk hønseæggehv.
» 401 og 402	»	7 cm ³	» proteinfri frisk »æggehv.opl.«
» 383 og 384	»	3,8 cm ³	» } 10 % opl. af tørret kines. æggehv.
» 379 og 380	»	7,6 cm ³	
» 391 og 392	»	3,8 cm ³	» } proteinfri 10 % opl. af tørret kines. æggehv.
» 387 og 388	»	7,6 cm ³	
» 443 og 444	»	15 cm ³	» }

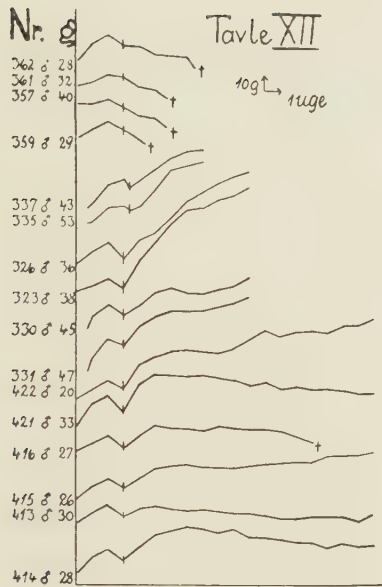


TAVLE XI

viser vægtskurverne for 3-ugers hanrotter, der faar vor oprindelige jordnøddoliebasalkost + tran, efter 3 ugers forløb med tillæg af rissstivelse aktiveret med et alkoholisk majsmelekstrakt. De nævnte procenter angiver den mængde af basalkostens rissstivelse, der er erstattet med aktiveret stivelse.

Nr. 296 og 297 faar	5 %	} aktiveret stivelse.
» 300 og 301	» 10 %	
» 304 og 305	» 20 %	
» 315 og 316	» 30 %	
» 351 og 352	» 40 %	
» 319 og 320	» 50 %	
» 336 og 340	» 100 %	

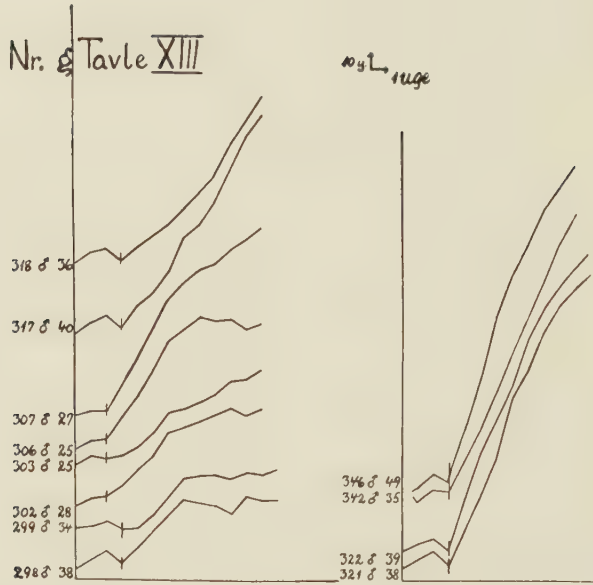
Forskellen i vækst for henholdsvis nr. 336 og 340 — og 351 og 352 er det ikke lykkedes mig at forklare.



TAVLE XII.

viser vægtekurverne for 3-ugers hanrotter, der faar vor oprindelige jordnødbasalkost + tran, efter 3 ugers forløb med tillæg af forskellige formodede Br-vitaminkilder.

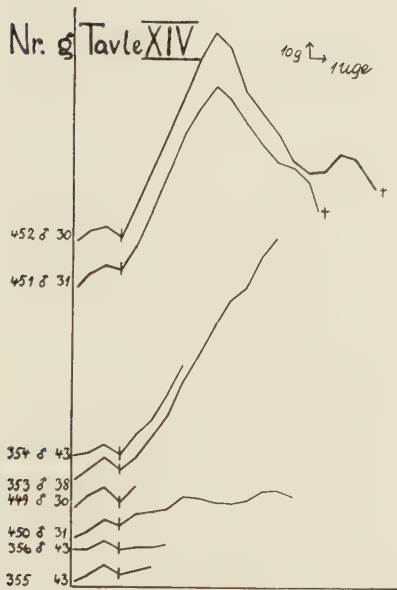
Nr. 413 og 414	faar 0,01 g dagl.	
» 415 og 416	» 0,02 g »	} Internat. Br-vitaminstand.
» 421 og 422	» 0,04 g »	
» 330 og 331	» 2 dr. 3 × ugentl.	} Peters ekstr.
» 323 og 326	» 4 dr. 3 × »	
» 335 og 337	» 4 dr. 3 × »	} do. originalt.
» 357 og 359	» 8 dr. 3 × »	
» 361 og 362	» 16 dr. 3 × »	} Trækuladsorb. majsmelekstr.



TAVLE XIII

viser vægtskurverne for 3-ugers hanrotter, der faar vor oprindelige jord-nøddoliebasalkost + tran, efter 3 ugers forløb med tillæg af aktiveret stivelse og bryggeriovergærekstrakt autoklaveret 5 timer ved 1 atmosfære ($1 \text{ cm}^3 = 2 \text{ g}$ tørtgær).

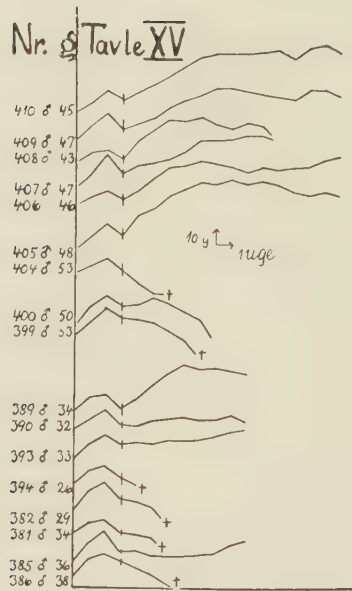
Nr. 298 og 299	faar	5 %	} aktiveret stivelse + gærekstr. $1,5 \text{ cm}^3$ $3 \times$ ugentl.
» 302 og 303	»	10 %	
» 306 og 307	»	20 %	
» 317 og 318	»	30 %	
» 321 og 322	»	50 %	
» 342 og 346	»	100 %	



TAVLE XIV

viser vægtkurverne for 3-ugers hanrotter, der faar vor oprindelige jord-nødoliebasalkost + tran, efter 3 ugers forløb med tillæg af aktiveret stivelse og bagerigærekstrakt autoklaveret 5 timer ved $1\frac{1}{2}$ atmosfære (1 cm³ = 2 g tørgær).

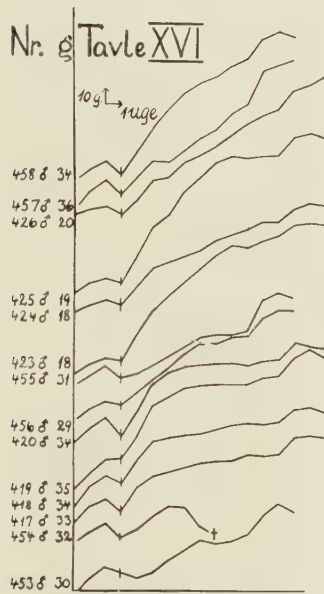
Nr. 355 og 356 faar	} 40 % aktiv. stivelse + gærekstr.	1,5 cm ³ 3 × ugentl.
» 449 og 450 »		3 cm ³ 3 × »
» 353 og 354 »		1,5 cm ³ 3 × »
» 451 og 452 »		3 cm ³ 3 × »
» 355, 356, 449 og 354 reficerede.		



TAVLE XV

viser vægtnkurverne for 3-ugers hanrotter, der faar vor oprindelige jordnødbasalkost + tran, efter 3 ugers forløb med tillæg af forskellige æggehvidepræparationer og enten 20 % aktiveret stivelse eller international B₁-vitaminstandard.

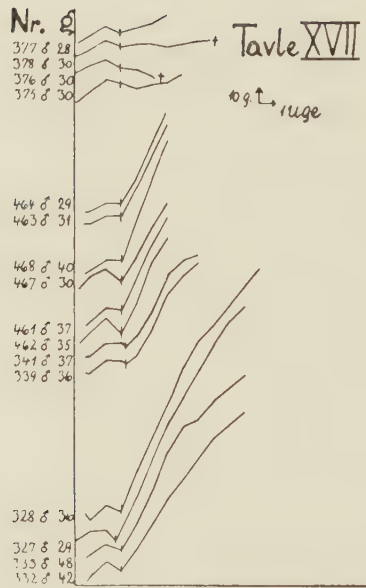
Nr. 385 og 386	faar 3,5 cm ³ dagl.	10 % opl. af tørret	
» 381 og 382	» 7,0 cm ³ »	kines. æggehv.	
» 393 og 394	» 3,8 cm ³ »	proteinfri 10 % opl.	+ 20 % aktiveret sti- velse.
» 389 og 390	» 7,6 cm ³ »	af tørret kines. æg- gehvide	
» 399 og 400	» 5,0 cm ³ »	frisk hønseæggehv.	+ internat. B ₁ stand. 0,01 g dagl.
» 404	» 7,0 cm ³ »	proteinfri frisk »ægge- hvideopl.«	
» 405 og 406	» 5,0 cm ³ »	frisk hønseæggehv.	
» 407 og 408	» 7,0 cm ³ »	proteinfri frisk »ægge- hvideopl.«	
» 409 og 410	» 7,6 cm ³ »	proteinfri 10 % opl. af tørret kines. æggehv.	



TAVLE XVI

viser vægtkurverne for 3-ugers hanrotter, der faar vor oprindelige jordnøddoliebasalkost + tran, efter 3 ugers forløb med tillæg af proteinfri 10 % opløsning af tørret kinesisk æggehvite og international B₁-vitamin-standard.

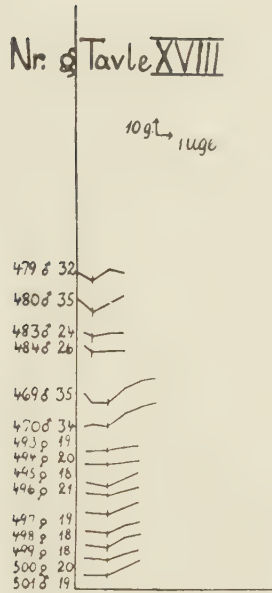
Nr. 453 og 454	faar	30 cm ³	dagl.	$\left. \begin{array}{l} \text{proteinfri} \\ 10 \% \text{ opl.} \\ \text{af tørret} \\ \text{kines.} \\ \text{æggehv.} \end{array} \right\} \begin{array}{l} 0,04 \text{ g dagl.} \\ \\ 0,02 \text{ g dagl.} \\ 0,01 \text{ g dagl.} \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} \text{proteinfri} \\ 10 \% \text{ opl.} \\ \text{af tørret} \\ \text{kines.} \\ \text{æggehv.} \end{array}} \right\} \begin{array}{l} \text{internat.} \\ \text{B}_1\text{-stand.} \end{array}$
» 417 og 418	»	7,6 cm ³	»	
» 419 og 420	»	15 cm ³	»	
» 455 og 456	»	30 cm ³	»	
» 423 og 424	»	7,6 cm ³	»	
» 425 og 426	»	15 cm ³	»	
» 457 og 458	»	30 cm ³	»	



TAVLE XVII

viser vægtkurverne for 3-ugers hanrotter, der faar vor oprindelige jord-nødoliebasalkost + tran, efter 3 ugers forløb med tillæg af Peters Br-vitaminekstrakt eller trækuladsorberet majsmelekstrakt og 5 timer ved $1\frac{1}{2}$ atmosfære autoklaveret bryggeriovergærekstrakt ($1 \text{ cm}^3 = 2 \text{ g}$ tørgær) eller bagerigærekstrakt ($1 \text{ cm}^3 = 2 \text{ g}$ tørgær) autoklaveret forskellig tid ved forskelligt tryk.

Nr. 332 og 333	faar 2 dr. 3	×	ugentl.	<table><tr><td rowspan="3">Peters</td><td rowspan="3">1,5 cm³</td><td rowspan="3">3</td><td rowspan="3">×</td><td rowspan="3">ugentl. bryggerigærekstr.</td></tr><tr></tr><tr></tr><tr><td rowspan="3">Br-ekstr.</td><td rowspan="3">1,5 cm³</td><td rowspan="3">3</td><td rowspan="3">×</td><td rowspan="3">» bagerigærekstr.</td></tr><tr></tr><tr></tr><tr><td rowspan="3">trækul-adsorb.</td><td rowspan="3">3 cm³</td><td rowspan="3">3</td><td rowspan="3">×</td><td rowspan="3">» do. autokl. 5 t. v.</td></tr><tr></tr><tr></tr><tr><td rowspan="3">majsmel-ekstr.</td><td rowspan="3">3 cm³</td><td rowspan="3">3</td><td rowspan="3">×</td><td rowspan="3">» do. autokl. 5 t. v.</td></tr><tr></tr><tr></tr></table>	Peters	1,5 cm ³	3	×	ugentl. bryggerigærekstr.	Br-ekstr.	1,5 cm ³	3	×	» bagerigærekstr.	trækul-adsorb.	3 cm ³	3	×	» do. autokl. 5 t. v.	majsmel-ekstr.	3 cm ³	3	×	» do. autokl. 5 t. v.	
Peters	1,5 cm ³	3	×																						ugentl. bryggerigærekstr.
Br-ekstr.	1,5 cm ³	3	×		» bagerigærekstr.																				
trækul-adsorb.	3 cm ³	3	×		» do. autokl. 5 t. v.																				
majsmel-ekstr.	3 cm ³	3	×	» do. autokl. 5 t. v.																					
» 327 og 328	» 4 dr. 3	×	»																						
» 339 og 341	» 4 dr. 3	×	» (orig.)																						
» 461 og 462	» 2 dr. 3	×	»																						
» 467 og 468	» 2 dr. 3	×	»																						
» 463 og 464	» 4 dr. 3	×	»																						
» 375 og 376	» 16 dr. 3	×	»																						
» 377 og 378	» 16 dr. 3	×	»																						



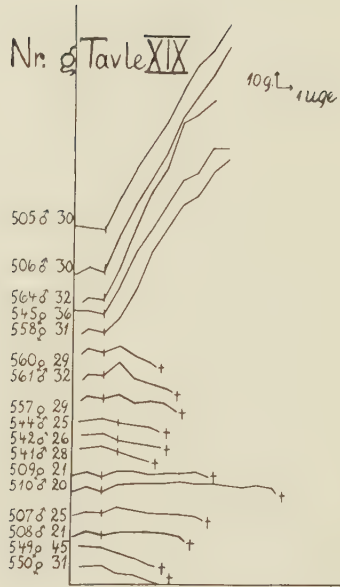
TAVLE XVIII

viser vægtkurverne for 3-ugers hanrotter, hvor nr. 500—501 faar jordnødolieormalkost (+ tran) tilberedt med kasein rensed og ristet (3 døgn 120° C) efter engelsk metode.

Nr. 469—470 faar jordnødolieormalkost (+ tran) tilberedt med kasein rensed efter vor oprindelige metode, hvorefter den er ristet 3 døgn ved 120° C.

Nr. 483—484 faar jordnødoliebasalkost (+ tran) med ristet kasein og tillæg af 2 dr. Peters Br-ekstrakt og 6 cm³ 10 % proteinfri »æggehvideopløsning« 3 gange ugentlig.

Nr. 479—480 faar jordnødoliebasalkost (+ tran) med ristet kasein og tillæg af 2 draaber Peters Br-ekstrakt og 1,5 cm³ bryggeriovergærekstrakt 3 gange ugentlig, autoklaveret 5 timer ved 1½ atmosfære.

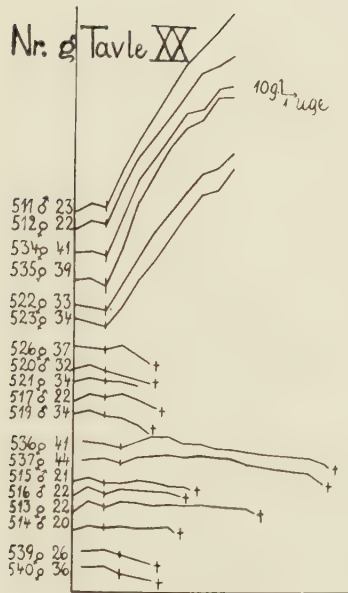


TAVLE XIX

viser vægtkurverne for 3-ugers rotter, der faar jordnøddoliebasalkost (+ tran) med kasein rensat efter den engelske metode dog uden ristning, efter 2 ugers forløb med tillæg af nævnte ekstrakter.

Nr. 549 og 550 er negative kontroller.

- | | | | | | |
|-------------------|---|---------------|---------------------|---|---------|
| » 507 og 508 faar | } | Peters | 2 dr. 3 | × | ugentl. |
| » 509 og 510 » | | Br-ekstr. | 4 dr. 3 | × | » |
| » 541 og 542 » | } | Bagerigær- | 1 cm ³ 3 | × | ugentl. |
| » 544 og 557 » | | ekstr. au- | 2 cm ³ 3 | × | » |
| » 560 og 561 » | | tokl. 5 t. v. | 4 cm ³ 3 | × | » |
| » 545 og 558 » | | 1½ atmosf. | 2 cm ³ 3 | × | » |
| » 564 » | } | | 4 cm ³ 3 | × | » |
| | | | | | » |
- » 505 og 506 er positive kontroller (5 % torgær i kosten).

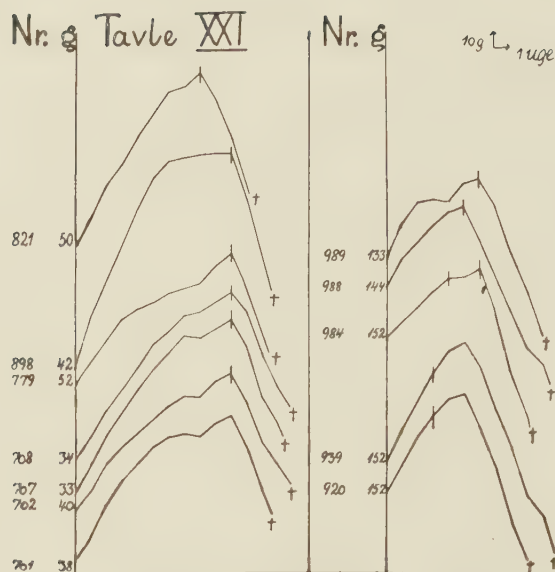


TAVLE XX

viser vægtkurverne for 3-ugers rotter, der faar jordnøddoliebasalkost (+ tran) med kasein rensat efter den amerikanske metode efter 2 ugers forløb med tillæg af nævnte ekstrakter.

Nr. 539 og 540 er negative kontroller.

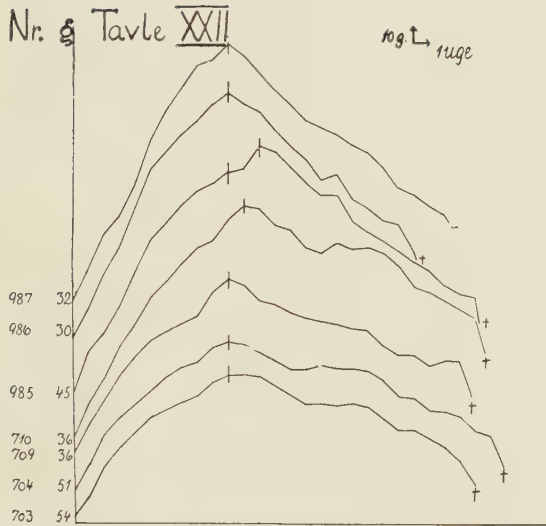
- | | | | | |
|---|---|---------------------|---|---------|
| » 513 og 514 faar | $\left\{ \begin{array}{l} \text{Peters} \\ \text{Br-ekstr.} \end{array} \right.$ | 2 dr. 3 | × | ugentl. |
| » 515 og 516 » | | 4 dr. 3 | × | » |
| » 536 og 537 » | $\left\{ \begin{array}{l} \text{Bageri-} \\ \text{gærekstr.} \end{array} \right.$ | 8 dr. 3 | × | » |
| » 517 og 519 » | | 1 cm ³ 3 | × | » |
| » 520 og 521 » | $\left\{ \begin{array}{l} \text{autokl.} \\ \text{5 t. v.} \end{array} \right.$ | 2 cm ³ 3 | × | » |
| » 526 » | | 4 cm ³ 3 | × | » |
| » 522 og 523 » | $\left\{ \begin{array}{l} \text{5 t. v.} \\ \text{1 1/2 atmosf.} \end{array} \right.$ | 2 cm ³ 3 | × | » |
| » 534 og 535 » | | 4 cm ³ 3 | × | » |
| » 511 og 512 er positive kontroller (5 % tørtgær i kosten). | | | | |
- } + Peters } 2 dr. 3 × ugentl.
} Br-ekstr. } 4 dr. 3 × »



TAVLE XXI

viser vægtkurverne for 12 hanrotter, der er bragt til at vokse godt ved — foruden tran — at give rigeligt B_1 - og B_{12} -vitamin som tillæg til vor ny B-vitaminfri basalkost (amerikansk rensset kasein). De sidste 5 kurver viser kun disses toppunkt. Ved mærket fratages alle dyrene B_1 -vitamin. Nr. 920 og 939 har i lang tid faaet meget stort tilskud af B_1 -vitamin-ekstrakt, hvorfor disse dyrs B_1 -vitamindepoter er ca. 2 uger om at udtømmes.

Nr. 984 faar i to uger (mellem de to mærker) rigelig B_1 -vitaminekstrakt tilført, uden at der aflejres noget større depot.

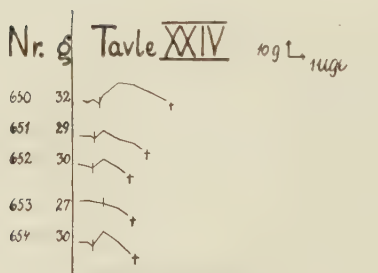
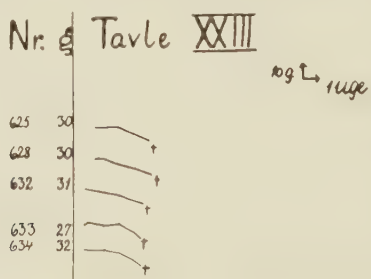


TAVLE XXII

viser vægtskurverne for 7 hanrotter, der er bragt til at vokse godt ved — foruden tran — at give rigeligt B_I- og B_{II}-vitamin som tillæg til vor ny B-vitaminfri basalkost (amerikansk rensket kasein). Ved mærket frages alle dyrene B_{II}-vitamin. Nr. 985 faar i 2 uger (mellem de 2 mærker) rigeligt B_{II}-vitaminekstrakt tilført, uden at der aflejres noget større depot.

Følgende tavler XXIII—XLIII viser en del vægtkurver fra rotter, som har følgende tilfælde: overalt er anvendt 3-ugers hanrotter, som alle har faaet vor ny B-vitaminfri basalkost + tran; naar vægttab indtræder (ved første mærke paa kurven) gives til dyrene paa tavle XXIII—XXXV inkl. dagligt tillæg af 1 cm³ B₁₂-vitaminekstrakt indtil vægttab paany indtræder (ved det andet mærke paa kurven) og til dyrene paa tavle XXXVI—XLIII inkl. dagligt tillæg af 1 dr. Peters B₁₂-vitaminekstrakt indtil vægttab atter indtræder (ved det andet mærke paa kurven).

Fra tidspunktet, som angives ved det andet mærke paa kurven, gives for de to hovedgrupper dyr i 10 uger vekslende mængder af henholdsvis B₁₂-vitamin og B₁₂-vitamin, som nedenfor angivet.

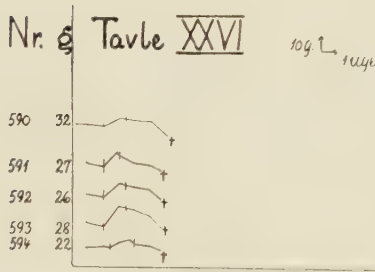
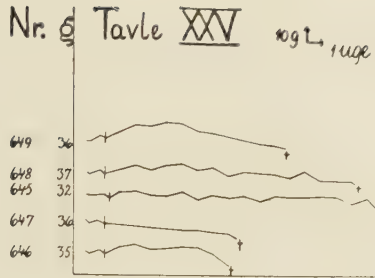


TAVLE XXIII

viser vægtkurverne for 5 helt negative kontrolrotter.

TAVLE XXIV

viser vægtkurverne for 5 delvis negative kontrolrotter, der faar B₁₂-vitaminekstrakt 1 cm³ daglig.

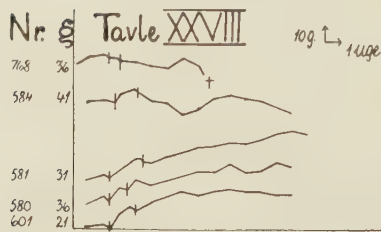
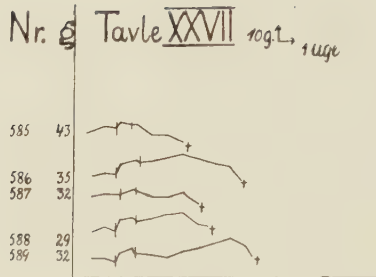


TAVLE XXV

viser vægtskurverne for 5 delvis negative kontrolrotter, der faar Peters Br-vitaminekstrakt 1 draabe daglig.

TAVLE XXVI

viser vægtskurverne for 5 rotter, der faar B₁₂-vitaminekstrakt 1 cm³ og standard acid clay 0,0002 g daglig.

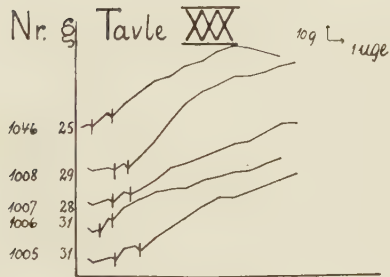
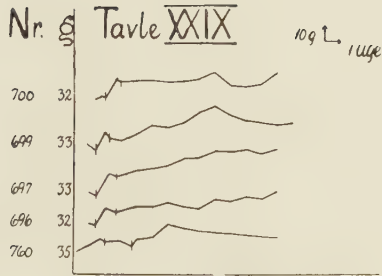


TAVLE XXVII

viser vægtekurverne for 5 rotter, der faar B₁₂-vitaminekstrakt 1 cm³ og standard acid clay 0,001 g daglig.

TAVLE XXVIII

viser vægtekurverne for 5 rotter, der faar B₁₂-vitaminekstrakt 1 cm³ og standard acid clay 0,002 g daglig.

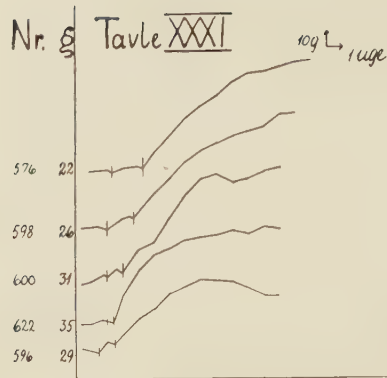


TAVLE XXIX

viser vægtekurverne for 5 rotter, der faar B₁₂-vitaminekstrakt 1 cm³ og standard acid clay 0,005 g daglig.

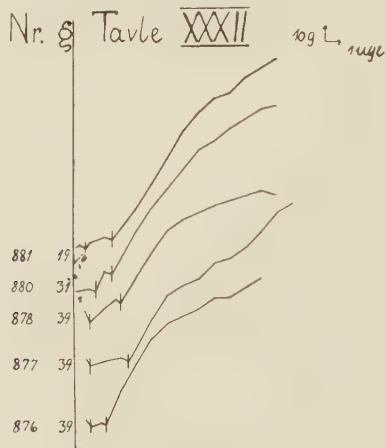
TAVLE XXX

viser vægtekurverne for 5 rotter, der faar B₁₂-vitaminekstrakt 1 cm³ og standard acid clay 0,0075 g daglig.



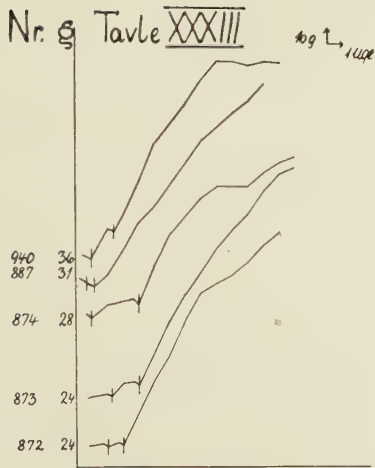
TAVLE XXXI

viser vægtekurverne for 5 rotter, der faar B₁₂-vitaminekstrakt 1 cm³ og standard acid clay 0,01 g daglig.



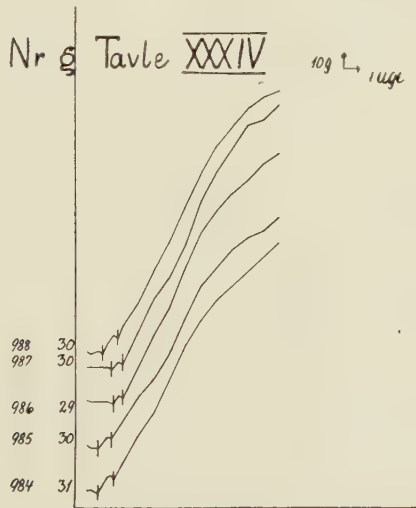
TAVLE XXXII

viser vægtekurverne for 5 rotter, der faar B₁₂-vitaminekstrakt 1 cm³ og standard acid-clay 0,015 g daglig.



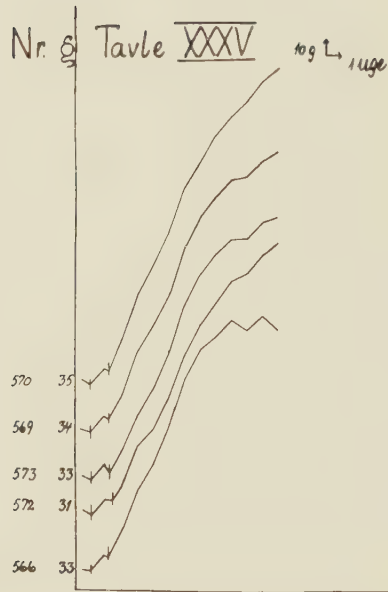
TAVLE XXXIII

viser vægtkurverne for 5 rotter, der faar B₁₂-vitaminekstrakt 1 cm³ og standard acid clay 0,02 g daglig.



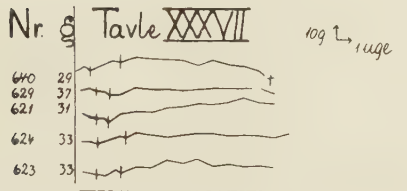
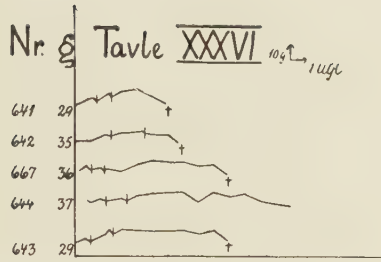
TAVLE XXXIV

viser vægtkurverne for 5 rotter, der faar B₁₂-vitaminekstrakt 1 cm³ og standard acid clay 0,03 g daglig.



TAVLE XXXV

viser vægterkurverne for 5 rotter, der faar B₁₂-vitaminekstrakt 1 cm³ og standard acid clay 0,04 g daglig.



TAVLE XXXVI

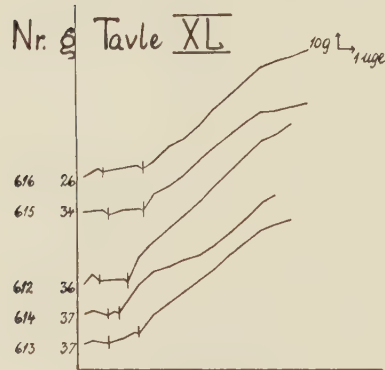
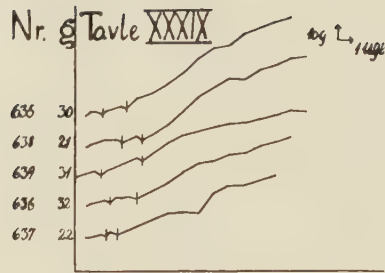
viser vægkurverne for 5 rotter, der faar Peters B_I-vitaminekstrakt 1 draabe og B_{II}-vitaminekstrakt 0,005 cm³ daglig.

TAVLE XXXVII

viser vægkurverne for 5 rotter, der faar Peters B_I-vitaminekstrakt 1 draabe og B_{II}-vitaminekstrakt 0,01 cm³ daglig.

TAVLE XXXVIII

viser vægkurverne for 5 rotter, der faar Peters B_I-vitaminekstrakt 1 draabe og B_{II}-vitaminekstrakt 0,05 cm³ daglig.

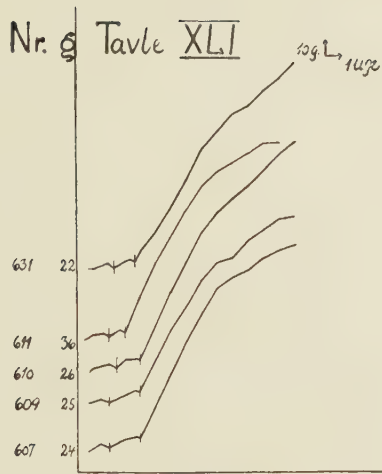


TAVLE XXXIX

viser vægtekurverne for 5 rotter, der faar Peters B_I-vitaminekstrakt 1 draabe og B_{II}-vitaminekstrakt 0,1 cm³ daglig.

TAVLE XL

viser vægtekurverne for 5 rotter, der faar Peters B_I-vitaminekstrakt 1 draabe og B_{II}-vitaminekstrakt 0,2 cm³ daglig.



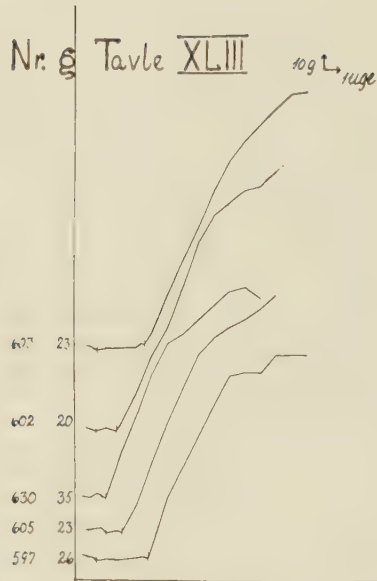
TAVLE XLI

viser vægkurverne for 5 rotter, der faar Peters B_I-vitaminekstrakt 1 draabe og B_{II}-vitaminekstrakt 0,5 cm³ daglig.



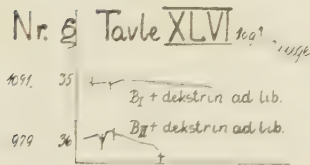
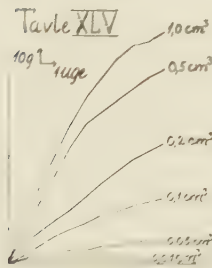
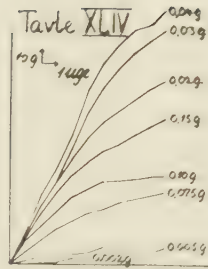
TAVLE XLII

viser vægkurverne for 5 rotter, der faar Peters B_I-vitaminekstrakt 1 draabe og B_{II}-vitaminekstrakt 1 cm³ daglig.



TAVLE XLIII

viser vægtskurverne for 5 rotter, der faar Peters B_I-vitaminekstrakt 1
draabe og B_{II}-vitaminekstrakt 2 cm³ daglig.



TAVLE XLIV

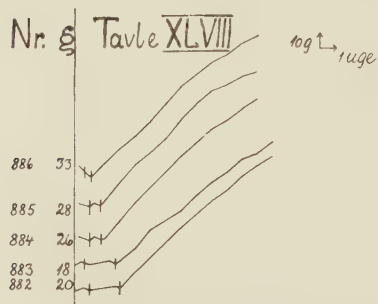
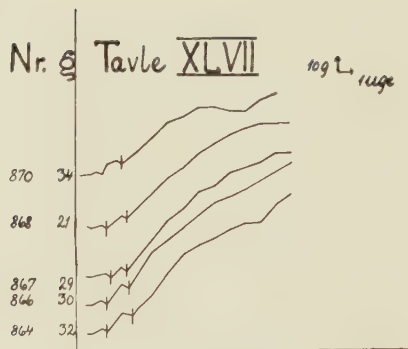
sammenfatter resultaterne af tavlerne XXVI—XXXV inkl.

TAVLE XLV

sammenfatter resultaterne af tavlerne XXXVI—XLII inkl.

TAVLE XLVI

viser, at dekstrin mangler saavel B_I- som B_{II}-vitamin.

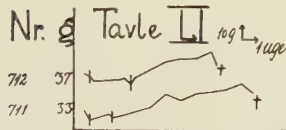
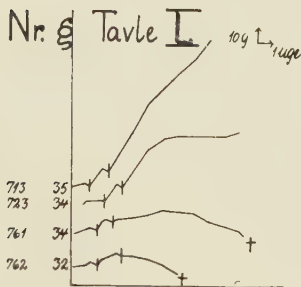
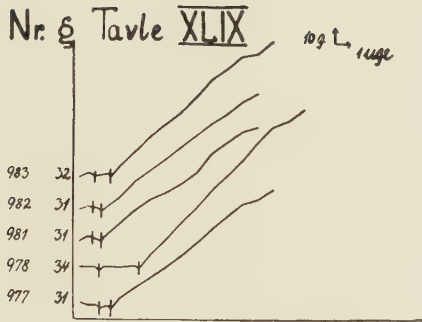


TAVLE XLVII

viser vægtkurverne for 5 rotter, der faar B₁₂-vitaminekstrakt 1 cm³ og standard acid clay (1 aar gammel) 0,01 g daglig.

TAVLE XLVIII

viser vægtkurverne for 5 rotter, der faar Peters B₁₂-vitaminekstrakt 1 draabe og B₁₂-vitaminekstrakt 0,2 cm³ daglig.



TAVLE XLIX

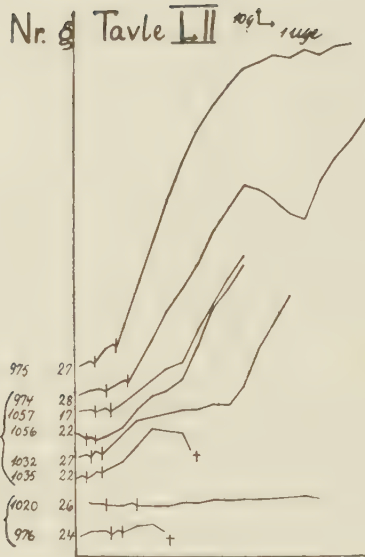
viser vægtkurverne for 5 rotter, der faar Peters B₁₂-vitaminekstrakt 1 draabe og B₁₂-vitaminekstrakt (1 aar gammelt) 0,2 cm³ daglig.

TAVLE L

viser vægtkurverne for 4 rotter nr. 713, 723, 761 og 762, der som tillæg til B₁₂-vitaminfri kost henholdsvis faar forskellige doser af Peters B₁₂-vitaminekstrakt nemlig $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$ og $\frac{1}{10}$ draabe daglig.

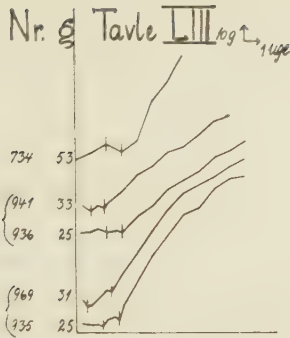
TAVLE LI

viser vægtkurverne for 2 rotter, der som tillæg til B₁₂-vitaminfri kost begge faar 0,5 g af den internationale B₁₂-vitaminstandard daglig.



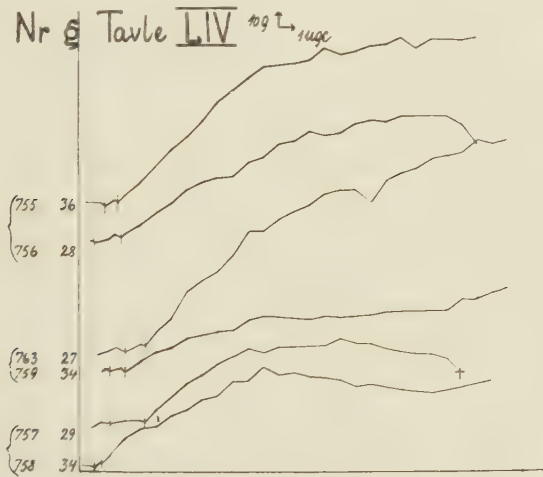
TAVLE LII

viser vægtekurverne for 8 rotter. Nr. 976 og 1020 faar Peters B₁-vitamin-ekstrakt 1 draabe daglig som tillæg til vor sædvanlige B-vitaminfri basalkost, hvor al stivelsen er erstattet med aktiveret stivelse. — Nr. 975 faar vort B₁₁-vitaminekstrakt 1 cm³ daglig som tillæg til vor sædvanlige B-vitaminfri basalkost, hvor 75 % af stivelsen er erstattet med aktiveret stivelse. — Nr. 974, 1032, 1035, 1056 og 1057 faar vort B₁₁-vitaminekstrakt 1 cm³ daglig som tillæg til vor sædvanlige B-vitaminfri basalkost, hvor 40 % af stivelsen er erstattet med aktiveret stivelse.



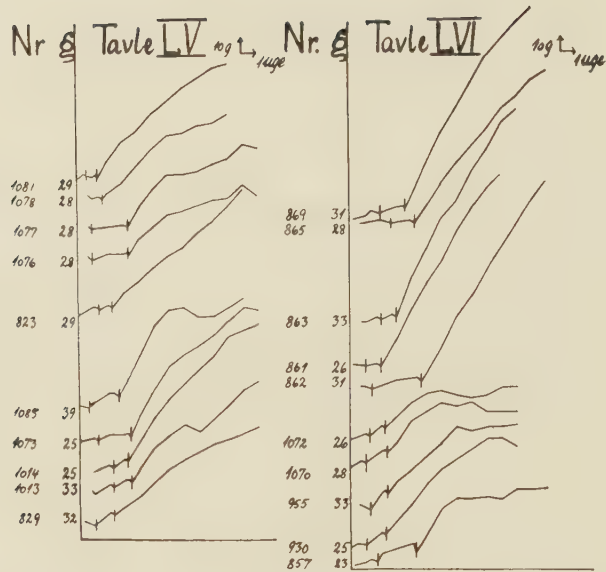
TAVLE LIII

viser vægtkurverne for 5 dyr. Nr. 935 og 969 faar 1 cm³ daglig af vort B₁₂-vitaminekstrakt og 0,25 cm³ daglig af uautoklaveret spritgærekstrakt, der er inddampet saaledes, at 1 cm³ = 2 g tørtgær. — Nr. 936 og 941 faar 1 draabe daglig af Peters B₁₂-vitaminekstrakt og 0,1 cm³ daglig af uautoklaveret spritgærekstrakt. — Nr. 734 faar 1 draabe daglig af Peters B₁₂-vitaminekstrakt og fra sidste mærke paa kurven 2 cm³ daglig af spritgærekstrakt autoklaveret 24 timer ved 1½ atmosfære.



TAVLE LIV

viser vægtkurverne for 6 rotter, der alle faar tillæg af 1 draabe Peters B₁₂-vitaminekstrakt daglig til vor B-vitaminfri basalkost. Nr. 758 og 757 faar tillige henholdsvis 5 og 10 cm³ frisk hønseæggehvide daglig. Nr. 759 og 763 faar tillige henholdsvis 3,5 og 7 cm³ daglig af en 10 % opløsning af tørret kinesisk æggehvide. — Nr. 756 og 755 faar henholdsvis 1 cm³ og 5 cm³ daglig af en proteinfri 10 % opløsning af tørret kinesisk æggehvide, der atter er koncentreret saaledes, at ½ cm³ = 0,6 g tørstof = 5 g frisk æggehvide.

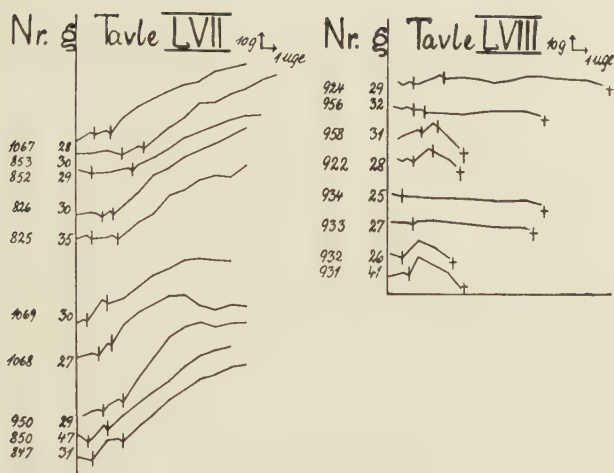


TAVLE LV

viser vægtkurverne for 10 rotter, der alle faar vor B-vitaminfri grundkost og tran. Nr. 829, 1013, 1014, 1073 og 1085 faar tillige saavel 1 cm³ B₁₂-vitaminekstrakt som 0,10 g overgær daglig. — Nr. 823, 1076, 1077, 1078 og 1081 faar saavel 1 draabe Peters B₁₂-vitaminekstrakt som 0,20 g overgær daglig.

TAVLE LVI

viser vægtkurverne for 10 rotter, der alle faar vor B-vitaminfri grundkost og tran. Nr. 857, 930, 955, 1070 og 1072 faar tillige saavel 1 cm³ B₁₂-vitaminekstrakt som 0,025 g undergær daglig. — Nr. 861, 862, 863, 865 og 869 faar saavel 1 draabe Peters B₁₂-vitaminekstrakt som 0,40 g undergær daglig.

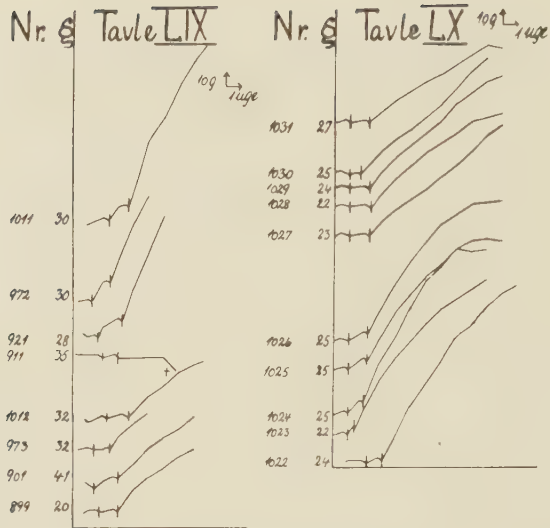


TAVLE LVII

viser vægtkurverne for 10 rotter, der alle faar vor B-vitaminfri grundkost og tran. Nr. 847, 850, 950, 1068 og 1069 faar tillige saavel 1 cm³ B₁₂-vitaminekstrakt som 0,25 g bagerigær daglig. — Nr. 825, 826, 852, 853 og 1067 faar saavel 1 draabe Peters B₁₂-vitaminekstrakt som 0,10 g bagerigær daglig.

TAVLE LVIII

viser vægtkurverne for 8 rotter, der alle med undtagelse af nr. 931—934 faar vor B-vitaminfri grundkost og tran. Nr. 931—934 faar dog en grundkost, hvor stivelsen er ombyttet med glukose. Nr. 931 og 932 faar tillige B₁₂-vitaminekstrakt 1 cm³ daglig, — nr. 933 og 934 Peters B₁₂-vitaminekstrakt 1 draabe daglig. — Nr. 922 og 958 faar tillæg af B₁₂-vitaminekstrakt 1 cm³ daglig samt Readers saltblanding ad libitum. — Nr. 924 og 956 faar tillæg af Peters B₁₂-vitaminekstrakt 1 draabe daglig samt Readers saltblanding ad libitum.



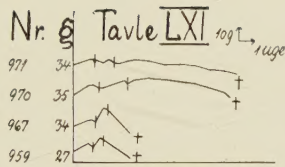
TAVLE LIX

viser vægtkurverne for 8 rotter, der alle faar vor B-vitaminfri grundkost og tran.

Nr. 899	faar 0,4 g syntetisk gær dagl.	
» 901	» 0,2 g » » »	} + Peters B _I -vitamin- ekstr. 1 dr. dagl.
» 973	» 0,2 g » » »	
» 1012	» 0,2 g frisk » » »	
» 911	» 0,08 g » » »	} + B _{II} -vitaminekstr. 1 cm ³ dagl.
» 972	» 0,25 g » » »	
» 1011	» 0,25 g frisk » » »	

TAVLE LX

viser vægtkurverne for 10 rotter, der alle faar vor B-vitaminfri grundkost og tran. — Nr. 1022, 1023, 1024, 1025 og 1026 faar tillige saavel 1 cm³ B_{II}-vitaminekstrakt som 0,04 g undergær daglig. — Nr. 1027, 1028, 1029, 1030 og 1031 faar saavel 1 draabe Peters B_I-vitaminekstrakt som 0,2 g undergær daglig.



TAVLE LXI

viser vægtekurverne for 4 rotter, der faar vor B-vitaminfri grundkost og tran. — Nr. 970 og 971 faar daglig 1 draabe Peters B₁₂-vitaminekstrakt og koncentreret Readers substrat ad libitum. — Nr. 959 og 967 faar daglig 1 cm³ af vort B₁₂-vitaminekstrakt og koncentreret Readers substrat ad libitum.

VALD. PEDERSENS BOGTR. KØBEN.